

生命科学名著

〔美〕伊丽莎白 H.布莱克本
卡罗尔 W.格雷德 著
张玉静 等 译

端粒

TELOMERES



科学出版社

Q-1118.0101

● 责任编辑：王 静

● 封面设计：槐寿明

ISBN 7-03-009993-1



ISBN 7-03-009993-1/Q · 1118

定 价：48.00 元

端粒

[美]伊丽莎白 H.布莱克本 卡罗尔 W.格雷德 著

张玉静 等译

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书为英文版 TELOMERES 中译本。原书由美国加州大学旧金山分校的伊丽莎白 H. 布莱克本博士和冷泉港实验室的卡罗尔 W. 格雷德博士主编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)1995 年出版。本书全面地介绍了目前端粒和端粒酶的结构、功能特性以及端粒对生命科学研究领域中的意义。读者还可以从端粒研究这个角度出发,对目前生物技术发展现状和应用有一个实际的了解和体会。

本书可作为医学、生命科学及相关领域科研人员的参考书,还可作为研究生及大学生的辅助读物。

Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider

TELOMERES

© Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995

All rights reserved

图字:01-1999-2150

图书在版编目(CIP)数据

端粒/[美]布莱克本(Blackburn, E. H.)等著;张玉静等译. —北京:科学出版社, 2002. 5

ISBN 7-03-009993-1

I. 端… I. ①布…②张… II. 染色体端粒-研究 N. Q243

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 087754 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002 年 5 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2002 年 5 月第一次印刷 印张:17 1/2

印数:1—2 000 字数:399 000

定价:48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

谨以本书纪念
巴巴拉·麦克林托克

本书译者名单

主 译： 张玉静 吴东林

其他译者： 阮承迈 马鹤雯 赵志辉
 刘庆双 张艳宇 连继勤
 齐 超 展德文 陈守义
 张忠芳

前 言

自 1978 年发现染色体末端的 DNA 重复序列以来,人们对端粒的分子结构与功能的研究兴趣越来越浓。作为作者,我们希望本书能够非常及时地反映出端粒不同领域中的进展情况。这些领域的研究已经开始解决端粒生物学方面长期以来悬而未决的问题。现已发现包括哺乳动物细胞在内的很多真核细胞都具有相似的串联重复序列,而且这些在种系发生上属于不同界的细胞之间的重复序列,在功能上可以相互代替,这就更引起了研究者的兴趣。研究人员发现端粒长度的维持不是以通常的复制方式,而是以一种特殊的 RNP 聚合酶——端粒酶来实现的。那些研究细胞生物学基本机制的科学家们对这一发现表现出极大的热情。最近发现端粒酶的活性与人的肿瘤有联系,其潜在的临床意义引起了人们的关注。对于端粒的研究,像很多其他的研究一样,也存在某些例外情况,这为我们进一步探索其分子生物学功能提供了新思路。例如,芽殖酵母(budding yeast)具有很长的端粒重复序列,且 G+T 含量几乎没有差异,它为端粒序列的可能组成提供了证据,也为了解酵母端粒酶的特性提供了途径。此外令人感到有趣的是,果蝇(*Drosophila*)(最先在其体内发现端粒功能)似乎是以一种不同于许多其他真核生物的方式解决了端粒维持的问题。

作者通过本书向读者介绍了端粒所有主要研究领域中的背景内容,同时还注重跟踪发展迅速的有关研究领域。作者希望本书能为刚刚步入端粒领域研究的科学家和在此领域有多年工作经验的科学家提供有价值的参考内容。在第一章中,Joseph Gall 博士概述了细胞中端粒的基本功能,提供了很有价值的文献,同时也为后续各章的内容作了必要的铺垫。

本书的面世是与很多人的努力分不开的,我们在此一并对他们表示感谢。我们感谢作者们能够及时交稿及在删掉了他们章节的重叠部分时表现出理解的态度。此外还特别感谢冷泉港实验室出版社的 John Inglis、Nancy Ford、Patricia Barker 和 Inez Sialiano 给我们提供了帮助和真诚的建议。

E. H. Blackburn

C. W. Greider

目 录

前言

第一章	末端研究的起始：端粒概念的由来	(1)
	(<i>Joseph G. Gall</i>)	
第二章	端粒 DNA 结构	(8)
	(<i>Eric Henderson</i>)	
第三章	端粒酶生物化学和调控	(27)
	(<i>Carol W. Greider</i>)	
第四章	端粒蛋白质	(50)
	(<i>Guowei Fang & Thomas R. Cech</i>)	
第五章	酵母端粒：功能、结构与复制	(76)
	(<i>Virginia A. Zakian</i>)	
第六章	酿酒酵母中端粒的位置效应和转录沉默	(98)
	(<i>David Shore</i>)	
第七章	发育过程中染色体的程序化愈合	(135)
	(<i>Elizabeth H. Blackburn</i>)	
第八章	非程序化和工程性染色体断裂	(152)
	(<i>Howard Cooke</i>)	
第九章	端粒与衰老	(170)
	(<i>Calvin B. Harley</i>)	
第十章	人类癌症的端粒动力学和基因组的不稳定性	(183)
	(<i>Titia de Lange</i>)	
第十一章	端粒的细胞学	(205)
	(<i>Abby F. Dernburg, John W. Sedat, W. Zachaeus Cande & Hank W. Bass</i>)	
第十二章	果蝇端粒：一种特殊类型的端粒	(234)
	(<i>Mary-Lou Pardue</i>)	
第十三章	植物端粒	(257)
	(<i>Eric J. Richards</i>)	

第一章 末端研究的起始:端粒概念的由来

Joseph G. Gall

Department of Embryology

Carnegie Institution

Baltimore, Maryland 21210

有丝分裂的染色体,如果不加以特殊处理,其形状非常一致,皆为无结构的杆状,惟一有区别的地方是在纺锤丝附着的弯曲(bend)或缢痕(constriction)处。传统的细胞学家对这些染色体的末端不够重视,甚至到了 20 世纪才给它们命名。果蝇遗传学家 Hermann J. Muller 首先使用了“端粒”(telomere)这个名词,表明了他对此结构的理解。端粒的字面意义是末端的部分(end-part),由两个希腊词根“telos”(末端)和“meros”(部分)合并而成。“meros”常含有节段(segment)的含义,例如,蠕虫或昆虫的体节(metamere),所以“端粒”的意思是节段性结构的末端部分。更需要注意的是端粒一词的构成是按照“centromere”(着丝粒)和“chromomere”(染色粒)这类构词方式构成的,这样的词在 20 世纪 30 年代和 40 年代总带有细胞学和遗传学的含义。“centromere”是个纯粹的遗传学名词,虽然与细胞学的纺锤体附着区域或者动粒(kinetochore)意义接近,但更具有理论方面的意义,特别是含有“着丝粒对染色体的长期稳定性有重要作用”的概念。着丝粒被认为在第一次减数分裂过程中进行分离,因此给生物体(如真菌,具有有序的四联体)的遗传图谱提供了一个固定的位点。染色粒可以指分裂早前期沿染色体的全长存在的一系列小团块,但同样也具有遗传学的含义,即最小染色粒可能是单个基因。Muller 的端粒概念一开始就具有双重含义:作为染色体的物理末端,即末端染色粒,还作为一个具有一定特性的基因,其中最主要的特性是不能与其他的端粒或染色粒融合。

H. J. Muller: 果蝇端粒

Muller 在一次精彩的讲演中对端粒做出了最完整的阐述。这次演讲的地点是在 Woods Hole 的海洋生物学实验室,时间是 1938 年 9 月,题目为“The Remaking of Chromosomes”,后来在 *The Collecting Net* (Muller 1938) 杂志发表。*The Collecting Net* 这个名字听起来很古怪,但它是正规的科学杂志。由于在大多数的图书馆都很难找到该杂志,所以一般可在他的著作《遗传学研究》(*Studies in Genetics*) (Muller 1962) 一书中找到他的演讲稿,以下是他的一段叙述:

末端基因一定具有某种特殊的功能,即可以对染色体的末端起到封闭(sealing)的作用。从某种意义上讲,如果染色体的末端不被这样“封闭”,染色体就不会持续存在。所以为了区别于其他的基因,我们采用专门的一个词——“端粒”(这个词是我和 Darlington

一起,还有 Haldane 不谋而合地按照上面的意义同时使用的)。端粒具有单极性(unipolar),只与一个(而不是两个)基因连接——此基因在端粒的“近端”,这一点与其他所有的基因不同,其他的基因都具有双极性(bipolar),即和两个基因相连,每侧各有一个基因。因此双极性基因不能使用简单的切割方法把基因从它们连接的一侧去除,使之成为具有适当功能的单极基因。

显然,这不是一个细胞学家对染色体物理末端的描述!

在 Muller 提出这个概念的十年前,他一直特别注意观察 X 射线照射后的基因与染色体的行为。1927 年,他成功地利用 X 射线对果蝇进行了第一次人工诱变,这一项研究在 20 年后使他获得了诺贝尔奖。Muller 在对突变基因的分析中发现,很多突变与染色体的大量重排——倒位、易位和缺失有关,这一发现引起了极大的兴趣,他想进一步探讨其机理。Muller 知道 X 射线可以使染色体断裂,他仔细测量了 X 射线的剂量与“简单”突变和染色体重排之间的关系。得到的结果与其他几个研究者的结果相同,即简单突变与 X 射线的剂量呈正相关,但是染色体重排却不同。综合所有的数据表明易位和倒位的频率与 X 射线的剂量呈 $3/2$ 次方关系。Muller 当然希望这种关系应该是平方关系,这样他就可以论证重排包含由 X 射线照射后形成的两个断裂末端重新连接的过程。这样的话,易位与两个非同源染色体上分别出现一个断裂有关,而倒位和缺失与同一染色体上的两个断裂有关。尽管是这种剂量上的关系,Muller 仍然坚持染色体重排的 two-hit 模型,强调先发生相互独立的断裂,新断端再重新连接。很明显,在 Muller 所收集的突变体中,缺少严格的末端缺失和末端倒位。实际上,一些 X 射线诱发的倒位会在距染色体末端非常近的位置有一个断裂,有时会在非倒转末端(non-inverted tip)留下一两个已知的基因。起初 Muller 的分析方法基于遗传学角度,但 Painter 发现了巨型多线染色体(giant polytene chromosome)后(Painter 1933),人们对倒位和易位的本质可以通过直接的观察得到证实。Muller 对他自己的遗传与细胞学的研究做了如下的总结:

……一般说来,染色体结构上的变化,不是由简单的自行断裂或融合(fusion)组成,而是染色体的线性片段连接时发生交换的结果。也就是说,在交换过程中,染色质一个片段在某一点上从原来结合的部位脱落,并在此两个断端和另一个脱落的片段的两个断端结合。所以至少需要同时存在两个断裂,一片段在交换中,必须具有一个重新结合的问题,而且结合的部位一定要发生在两个断端之间,而不是原先的游离末端,或一个游离末端和一断端,或任何末端和一个游离末端,或任何末端和染色体的侧支(即发生分支)之间。人们至今感到奇怪和不解的是第一次研究端粒行为的实验是在果蝇上进行的,该实验形成了染色体末端帽子(cap)的概念。事实上果蝇染色体的端粒极为特殊(Biessmann et al. 1992, Pardue 本书)。

Barbara McClintock: 玉米的断裂-融合-桥循环

Muller 对 X 射线导致的果蝇染色体断裂与重排的分析极好地由 Barbara McClintock(巴巴拉·麦克林托克)同时进行的玉米实验所补充。McClintock(1941)应用自己命名的“断裂-融合-桥循环”这一概念分析了新形成的染色体末端。当一个双着丝粒染色体的两个着丝粒移动至有丝分裂纺锤体的两极,就会在两极之间形成一个染色体“桥”。在分

裂后期或末期,这个桥会断开,形成两个单着丝粒染色体,我们就称之为一个“断裂-融合-桥循环”,并具有新生成的末端,人们可以对它们的后续行为进行研究。只有阅读论文的原稿才可以体会到这项研究的精彩之处。McClintock 安排的实验使得新的双着丝粒染色体可以在第一次减数分裂时通过交换形成。这样她就可以根据自己的需要建立并分析各种“断裂-融合-桥”过程。她从细胞学的角度观察染色体,更为重要的是,在正进行“断裂-融合-桥循环”的组织中,通过对隐性基因标记(位于未断裂的同系物上)进行去屏蔽(unmasking)作用,从而确定出特定染色体区段丢失的位置和时间。

McClintock 发现在下一次有丝分裂之前,两个姐妹染色单体断端相互融合,形成了新的双着丝粒染色体,使“断裂-融合-桥循环”进入了下一代细胞。关于断裂染色体,她得出很多重要的结论,其中两个最重要的结论是(直接引述她的):

(1) 如果一个在前一次减数分裂后期断裂的染色体,通过雄性或雌性的配子体传递到原内胚乳核中,那么在内胚乳组织发育时的一系列细胞分裂过程中,“断裂-融合-桥循环”会继续进行。

(2) 相同的断裂染色体,如果通过卵子或精子传递到合子核中,则不会在孢子体组织的连续核分裂中形成桥式结构。断裂的末端愈合,整个的“断裂-融合-桥循环”完全终止。这样,McClintock 证实了 Muller 的发现,即新形成的染色体末端比较“黏”,易于与其他新形成的染色体末端结合,而正常的染色体末端非常稳定。她的研究还表明,这种黏性不属于 X 射线的特殊效应,而且在孢子体组织中具有可逆性。于是,McClintock 概括性地推测,认为影响断裂末端融合或者愈合的因素很可能与引起染色体断裂的方法以及断裂末端所处的生理环境有关。一个有趣的可能是端粒酶在配子体和内胚乳中没有活性,而在孢子体组织中有活性。

在 McClintock 的“断裂-融合-桥循环”研究过程中,她对染色体断裂后所造成的在遗传学与细胞学上的后果特别敏感。她意识到有一些记录不属于“断裂-融合-桥循环”的结果,这使得她提出可能存在转座元件的设想,这种元件的自发移动有时也会导致染色体的断裂。从一定的意义上讲,对端粒的兴趣引发了她的一系列实验,使得她在 1983 年获得了诺贝尔奖。

早期的形态学研究

尽管 Muller 和 McClintock 可以称得上是首次对端粒进行分析研究的人,但对于染色体末端的细胞学观察可以追溯到 19 世纪末期。Rabl(1885)可能是发表第一篇详细记录分裂间期细胞核中的染色体定向的人。Rabl 注意到,长的染色体常会折叠起来,并且使得染色体所有的末端处于细胞核的一侧。他正确地推测出这样的构象(后来称为“Rabl 定向效应”)反映了有丝分裂前染色体的极向运动。他还发现染色体末端有时也直接附着在核膜上。Rabl 定向效应在人蛔虫(*Ascaris*)的早期分裂时最为明显。这时处于分裂间期的核一侧呈圆形,另一侧形成突起,分裂前期的染色体又出现与分裂后期相同的染色体排列方向。Boveri(1909)以这种排列方式为基础,提出在分裂间期整个过程中每一个染色体保持这种存在方式,这在当时是一个争议比较大的问题。值得一提的是,在果蝇的巨唾液腺细胞核中也证明了有 Rabl 定向效应的存在,于是人们推测这种现象在多线染色体形成过程

的多次复制中保持不变(Hochstrasser et al. 1986; Dernburg et al. 本书)。Wilson (1925)在名为“染色体形态学问题”一章中,对 Rabl、Boveri 等早期研究者的研究进行了详尽的讨论,这些人的研究为我们今天理解染色体的结构与行为奠定了基础。

在第一次减数分裂的早前期,染色体末端几乎总是定向于细胞核一侧,并与核膜紧密结合。这里所谓的“花束”(bouquet)实际上就是 Rabl 定向效应,只不过是另外还涉及到成对的减数分裂时的染色体。另外,这是否为上一次有丝分裂的残留物,或是否为染色体配对时或配对后重新形成的现象,现在还不清楚。“花束”这一概念是 20 世纪初细胞学家非常熟悉的概念(Wilson 1925),在成百上千种动植物文献中被描述过。花束是构成一个更庞大构型的组分,这个构型还包括胞浆组分。所以,在很多的精母细胞和早期卵母细胞中,位于核膜一侧的染色体末端靠近细胞浆的中心粒(centriole)一侧,中心粒周围还有高尔基复合体。但是现在还不清楚染色体是如何附着在核膜上的。在电镜下,每对染色体的联会复合体刚好在核膜处突然结束。这种结合是否涉及到我们今天所定义的端粒,或者某些高度有序的结构还不清楚。近来对裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)分裂中的端粒研究,较好地证实了花束排列的广泛性。Chikashige 等(1994)采用抗体和原位杂交的技术,在整个核融合与合子的减数分裂过程中,追踪着丝粒(centromere)、端粒和纺锤体(spindle pole body,相当于酵母的中心粒),在所谓的马尾阶段(horse-tail stage),即相当于第一次减数分裂的前期,端粒在纺锤体附近集合在一起,而着丝粒则在核的对侧。与高等真核细胞相同,这种排列结构在细胞分裂时消失,这时着丝粒恢复了与纺锤体的联系。

很多年以来,细胞学家发现了很多染色体末端的特殊行为。Muller 和 McClintock 的研究非常清楚地表明,正常的染色体末端彼此之间不会形成永久性的联合,也不会与其他新形成的末端形成永久性的结合,但是可以在相互之间或与染色体其他部分形成暂时的结合,这种现象在着丝粒中尤为明显。两栖动物的灯刷状染色体在这方面最为明显,其中除端粒-着丝粒、着丝粒-着丝粒联合外,还经常发生端粒之间的联合(Callan 1986)。这些结合没有一个可以持续到第一次减数分裂以后,其意义还不清楚。在苍蝇体内多线染色体的末端之间也会有类似的结合,这种现象在有些动物体内表现得更为明显。很多年以前, Berendes 和 Meyer(1968)描述了海地果蝇(*Drosophila hydei*)唾液腺细胞核染色体末端的融合情况。在电镜下,他们检查了融合的末端,发现融合的末端具有致密的纤维样物质区域,与典型的分带(band)和带间(interband)不同。他们认为这样的区域就是“推测的端粒的形态学表现形式”。现在还不清楚这样的连接是代表了基本同源的端粒之间“正常”的配对(即染色体与染色体配对产生多线染色体)还是因为有末端异染色质的存在而形成。异染色质的功能之一就是能够形成非同源连接的能力。从获得 Bridges 的第一个多线染色体图谱以来,人们就认识到某些片段具有特别的非同源连接的能力,例如发生在染色体 2L 的碱基“折回”(fold-back)区。这些区域被认为是中间(intercalary)异染色质区域,与着丝粒周围更大的异染色质团块同样具有细胞遗传学的特性。无论过去人们推测果蝇染色体末端的异染色质具有什么样的功能,现在研究表明,这些异染色质区域同组成型异染色质一样具有重复序列(Pardue 本书),这一点在酵母中同样存在,其重复序列部分出现在端粒重复序列的近端。最近的遗传学研究表明转座(transpose)到酵母染色体近末端的基因会发生位置效应花斑(position-effect variegation),这从遗传学角度上说明了这样

的区域与典型的果蝇的异染色质区的行为非常相似(Sandell & Zakian 1992; Shore 本书)。

端粒的复制问题

今天的读者很难想像当初只有很少的研究人员从端粒的角度讨论 DNA,或是从 DNA 结构的角度研究端粒。我们可以再看一下 Gilson 等人(1993)在最近端粒综述开篇时的叙述:“DNA 单个分子组织成了真核细胞的染色体,其开头与结尾的部分为重复性的 DNA 片段,叫做端粒”。今天人们对端粒认识发生了变化,其原因也不难理解。实际上从 19 世纪 Miescher 和 Flemming 的早期研究开始,人们就已经知道 DNA 是细胞核与染色体中的主要组成成分。到了 20 世纪 60 年代,人们才完全认识到染色体是一条 DNA 分子(Gall 1981)。这一结论马上改变了对“端粒问题”的认识,不再是一个粗浅的细胞学定义了,而是受到人们高度重视的一个问题,它可以揭示出 DNA 分子末端的组成方式和行为方式。尽管在理论上问题已经很明确,但是具体实践证实却很难。这毫不奇怪,科学就是这样,理论永远走在实验的前面。

第一个要解决的理论问题是端粒的复制机理。Watson(1972)指出,标准的 DNA 复制是先用短 RNA 分子作引物,沿 $5' \rightarrow 3'$ 方向新链进行延伸,把不连续的片段连接起来。这种复制方法对于每一模板链的末端同样也是适用的。但是,在除去引物后,另一端上就会有一段不复制片段。Watson 的论文主要探讨 T7 DNA 的复制,并且介绍了如何通过连环化(concatemerization)的方法解决复制中的问题,这种方法有效地解决了末端复制问题。他得出的结论是:“线形分子的复制会产生连环体(concatemer),是成熟的病毒染色体完整的多连体。末端的重复序列是这种复制的先决条件。”很明显,对于病毒和细菌的环状 DNA 上染色体不存在末端问题。Cavalier-Smith(1974)就线形分子末端的回文(palindrome)序列,提出了新的模型。这个模型认为,DNA 链 3' 端的末端回文序列自行折回,为 DNA 聚合酶(polymerase)提供了必需的 3' 羟基,补上了互补链中的空位。理论上,染色体一端的回文序列与另一端的回文序列不同,可 Cavalier-Smith 认为在特定的生物体内,所有的端粒可能是相同的。这一观点可以解决这样的问题,即存在同源和异源染色体末端彼此相互连接的倾向性。这样的讨论说明,理论上,端粒的复制不是一个不可解决的问题,而且他们认为端粒尽可能具有共同的序列。但在实际中,找出这样相同的序列是一件异常艰难的工作,因为在典型真核细胞生物中末端的浓度特别低(果蝇 DNA 的 1.7×10^8 bp 中有 8 个末端,在人 DNA 的 3×10^9 bp 中有 46 个末端)。

纤毛虫的端粒:共有基序

第一个线索来自于具有特殊染色体的纤毛虫。人们早就知道纤毛虫体内有两个细胞核:小的叫做微核(micronucleus),具有典型的有丝分裂现象,可以在细胞学实验中看到染色体;另一个核叫做巨核(macronucleus),该核在细胞分裂中期萎缩。早期的细胞学家报道过很多这种“无丝分裂”的情况,但只有纤毛虫经得住时间的考验,但是人们对巨核的染色体变化一无所知。Prescott 与他的同事发现在下毛亚目(Hypotrichs)棘尾虫属(*Sty-*

lonychia)和尖毛虫属(*Oxytricha*)的巨核里 DNA 变成了很小的碎片,比微核染色体内的 DNA 小几个数量级(Prescott & Murti 1974)。最终他们发现这些碎片基本是游离态的基因。这是在细胞接合后,新巨核形成过程中,由种系(germ-line)染色体的片段化所产生的。在这个过程中,基因组序列大量丢失,每一个碎片的末端都形成了端粒。Prescott 认识到,这样产生的端粒其序列可能完全一致,所以开始对它展开测序工作。与此同时,我们的研究小组正在研究一个与此相关的课题,即四膜虫(*Tetrahymena*)巨细胞核中的 rDNA 分子结构。我们知道 rDNA 为 22kb 的回文序列分子,编码两个拷贝的 rRNA 前体(Karrer & Gall 1976)。这种 rDNA 与很多生物体内的 rDNA 一样,有很高的 GC 含量,可以通过氯化铯梯度离心的办法提纯。因为整个分子是一个回文序列,所以很有可能两个末端都是相同的,而且在电镜下,可以观察到该 DNA 是环状的还是连环状分子。Elizabeth Blackburn 刚一毕业就与剑桥大学的 Fred Sanger 一起决定测定这些分子的末端序列。令人欣慰的是,问题并不如先前认为的那样困难,因为这样的序列很简单(CCCCAA/GGGGTT),并且重复多次(Blackburn & Gall 1978)。此后不久,尖毛虫属和棘尾虫属巨核内的 DNA 分子的末端也被测定出来,其序列为 CCCCAAAA/GGGGTTTT(Oka et al. 1980; Klobutcher et al. 1981)。两种不同纤毛虫的序列很明显有着某种联系,但是我们还明白这样的序列与高等生物真核细胞端粒有什么样的关系。但毕竟我们还是在真核细胞的进化方向完全不同的生物体内确定了它的序列。事实也可能像病毒 DNA 分子末端一样,高等生物的端粒间也没有什么太多的相关性。然而不久,人们发现四膜虫重复序列可以在酵母内起到端粒的作用,而且酵母染色体内也有一种与之类似的序列(Szostak & Blackburn 1982)。最后人们在很多高等真核细胞(包括植物)端粒中利用原位杂交证明了 CA/GT 这样的重复序列的存在(Henderson 本书)。

本书的其他部分主要是接着这个问题讨论的。人们一旦找到共同的基序且从分子角度定义端粒时,就会在很多方面取得大幅度的进展。端粒酶的发现及其作为 RNP 携带具有端粒序列的 RNA 模板这一特点(Greider 本书),为解决这方面的问题提供了全新的理论。对端粒 DNA 的物理组成和与端粒有关的蛋白质的研究继续集中在染色体末端的特性上,以及对整体染色质的组成和 DNA 本身的理解上。最后,对近末端序列的遗传学研究,无论是酵母,还是果蝇,都预示着我们终会有一天能够搞清位置效应(position effect)的分子基础。我们高兴地看到,今天对于染色体的这个重要部分已经得到了极大的重视,我们也有充分信心在不久的将来会有更大的令人激动的发现。

参考文献

- Berendes, H.D. and G.F. Meyer. 1968. A specific chromosome element, the telomere of *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosoma* 25: 184-197.
- Biessmann, H., L.E. Champion, M. O'Hair, K. Ikenaga, B. Kasravi, and J.M. Mason. 1992. Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *EMBO J.* 11: 4459-4469.
- Blackburn, E.H. and J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120: 33-53.
- Boveri, T. 1909. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomen-individualität. *Arch. Zellforsch.* 3: 181-268.

- Callan, H.G. 1986. *Lampbrush chromosomes*, pp. 1–254. Springer-Verlag, Berlin.
- Cavalier-Smith, T. 1974. Palindromic base sequences and replication of eukaryotic chromosome ends. *Nature* **250**: 467–470.
- Chikashige, Y., D.-Q. Ding, H. Funabiki, T. Haraguchi, S. Mashiko, M. Yanagida, and Y. Hiraoka. 1994. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* **264**: 270–273.
- Gall, J.G. 1981. Chromosome structure and the C-value paradox. *J. Cell Biol.* (suppl.) **91**: 3s–14s.
- Gilson, E., T. Laroche, and S.M. Gasser. 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* **3**: 128–134.
- Hochstrasser, M., D. Mathog, Y. Gruenbaum, H. Saumweber, and J. Sedat. 1986. Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* **102**: 112–123.
- Karrer, K.M. and J.G. Gall. 1976. The macronuclear ribosomal DNA of *Tetrahymena pyriformis* is a palindrome. *J. Mol. Biol.* **104**: 421–453.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 3015–3019.
- McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234–282.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **8**: 182–195, 198.
- . 1962. The remaking of chromosomes. In *Studies in genetics: The selected papers of H.J. Muller*, pp. 384–408. Indiana University Press, Bloomington.
- Oka, Y., S. Shiota, S. Nakai, Y. Nishida, and S. Okubo. 1980. Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of *Stylonychia pustulata*. *Gene* **10**: 301–306.
- Painter, T.S. 1933. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* **78**: 585–586.
- Prescott, D.M. and K.G. Murti. 1974. Chromosome structure in ciliated protozoans. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 609–618.
- Rabl, C. 1885. Über Zelltheilung. *Morphologisches Jahrbuch* **10**: 214–330.
- Sandell, L.L. and V.A. Zakian. 1992. Telomeric position effect in yeast. *Trends Cell Biol.* **2**: 10–14.
- Szostak, J.W. and E.H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**: 245–255.
- Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**: 197–201.
- Wilson, E.B. 1925. Morphological problems of the chromosomes. In *The cell in development and heredity*, 3rd edition, ch. 11, pp. 828–915. Macmillan, New York.

第二章 端粒DNA 结构

Eric Henderson

Department of Zoology & Genetics
Iowa State University
Ames, Iowa 50011

端粒 DNA 序列

端粒的分子生物学研究始于 1978 年,当时 Blackburn 和 Gall (1978)报道了有纤毛的原生生物嗜热性四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)rDNA 基因的端粒重复序列。端粒限制片段可在琼脂糖凝胶上呈现特异的“模糊”(fuzzy)外观,这已成为端粒限制片段的标志。这种模糊条带的产生是由于在某一特定机体内的不同染色体上端粒长度的不均一性(length heterogeneity)所致。但是,并不是所有生物的端粒限制片段都会产生这种特征性的电泳条带。例如,有些下毛亚目纤毛虫和芽殖酵母的端粒限制片段,便可在琼脂糖凝胶上出现界限清晰的带(Klobutcher et al. 1981;Pluta et al. 1982;McEachern & Blackburn 1994)。除了端粒限制片段在琼脂糖凝胶上呈现模糊带外,第二个确定端粒位点的办法就是检测其对外切核酸酶 BAL 31 的敏感性。该酶可以从外向内地消解染色体末端 DNA,用 BAL 31 处理染色体,切除的第一部分就是端粒。结合出现模糊带和对 BAL 31 敏感这两点,已鉴定、克隆和确定了许多生物体的端粒序列(见表 2-1)。

表 2-1 端粒重复序列

生物名称	序列	参考文献
纤毛虫(Ciliate)		
四膜虫(<i>Tetrahymena</i>)	TTGGGG	Blackburn & Gall(1978)
瞬目虫(<i>Glaucoma</i>)	TTGGGG	Katzen et al. (1981)
草履虫(<i>Paramecium</i>)	TT[T/G]GGG	Forney & Blackburn(1988)
尖毛虫(<i>Oxytricha</i>)	TTTTGGGG	Klobutcher et al. (1981)
游仆虫(<i>Euplotes</i>)	TTTTGGGG	Klobutcher et al. (1981)
黏真菌(Slime mold)		
绒泡菌属(<i>Physarum</i>)	TTAGGG	Forney et al. (1987)
盘基网柄菌(<i>Dictyostelium</i>)	AG _{1~8}	Emery & Weiner(1981)
钙皮菌属(<i>Didymium</i>)	TTAGGG	Fornery et al. (1987)

生物名称	序列	参考文献
鞭毛虫 (Flagellate)		
锥虫 (<i>Trypanosoma</i>)	TTAGGG	Blackburn & Challoner(1984)
贾第虫 (<i>Giardia</i>)	TAGGG	Le Blancq et al. (1991)
孢子虫 (Sporozoan)		
疟原虫 (<i>Plasmodium</i>)	TT(T/C)AGGG	Ponzi et al. (1985)
真菌 (Fungi)		
支孢霉属 (<i>Cladosporium fulvum</i>)	TTAGGG	Coleman et al. (1993)
脉孢菌 (<i>Neurospora</i>)	TTAGGG	Schechtman(1990)
足孢菌 (<i>Podospira</i>)	TTAGGG	Javerzat et al. (1993)
组织胞浆菌 (<i>Histoplasma</i>)	TTAGGG	Woods & Goldman(1992)
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	T(G) _{2~3} (TG) _{1~6}	Shampay et al. (1984); McEachern & Hicks(1993)
裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	TTAC(A)G _{2~5}	Sugawara & Szostak(1993)
白假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)	ACGGATGTCTAAC- TTCTTGGTGT	McEachern & Hicks(1993)
热带假丝酵母 4414 (<i>Candida tropicalis</i> 4414)	AC/AGGATGTCACG- ATCATTGGTTGT	McEachern & Blackburn(1994)
热带假丝酵母 4443 (<i>Candida tropicalis</i> 4443)	AAGGATGTCACG- ATCATTGGTGT	McEachern & Blackburn(1994)
麦芽糖假丝酵母 (<i>Candida maltosa</i>)	ACGGATGCAGAC- TCGCTTGGTGT	McEachern & Blackburn(1994)
季也蒙假丝酵母 (<i>Candida guilliermondii</i>)	ACTGGTGT	McEachern & Blackburn(1994)
拟热带假丝酵母 (<i>Candida pseudotropicalis</i>)	ACGGATTTGATTAG- TTATGTGGTGT	McEachern & Blackburn(1994)
乳酸克鲁维酵母属 (<i>Kluyveromyces lactis</i>)	ACGGATTTGATTAG- GTATGTGGTGT	McEachern and Blackburn(1994)
光滑球假丝酵母 (<i>Candida glabrata</i>)	CTGGGTGCTGTGGGGT	McEachern & Blackburn(1994)
新型隐球菌 (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	TTA(G) _{4~6}	Edman(1992)
线虫 (Nematode)		
蛔虫 (<i>Ascaris</i>)	TTAGGC	Mueller et al. (1991)
副蛔虫 (<i>Parascaris univalens</i>)	TTGCA	Teschke et al. (1991)

续表

生物名称	序列	参考文献
新小杆线虫属(<i>Caenorhabditis elegans</i>)	TTAGGC	Cangiano & La Volpe (1993)
昆虫(Insect)		
家蚕(<i>Bombyx mori</i>)	TTAGG	Okazaki et al. (1993)
藻类(Algae)		
衣滴虫(<i>Chlamydomonas</i>)	TTTTAGGG	Petracek et al. (1990)
高等植物(Higher plant)		
拟南芥属(<i>Arabidopsis</i>)	TTTAGGG	Richards & Ausubel(1988)
番茄(tomato)	TT[T/A]GGG	Ganal et al. (1991)
脊椎动物(Vertebrate)		
人(<i>Homo Sapiens</i>)	TTAGGG	Moyzis et al. (1988)
鼠(<i>Mus spp.</i>)	TTAGGG	Kipling & Cooke(1990); Starling et al. (1990)

Blackburn 和 Gall 在 1978 年做了先驱性的工作,他们直接用化学方法测定四膜虫的端粒序列。证实四膜虫具有六聚体重复序列:CCCCAA/TTGGGG,同时还证明端粒重复序列具有极性,即在端粒的 3' 末端由 TTGGGG 链构成,而 5' 末端由 CCCCCA 链构成(见图 2-1)。为了方便,含有 TTGGGG 重复序列构成的链称为 G 链(G-strand)(互补链称为 C 链),但在有的物种中,这些链的端粒序列并不含有统计意义上明显多的 G 或 C 残基(McEachern & Blackburn 1994)。随后的大量实验表明,大多数端粒中这种方向性是保守

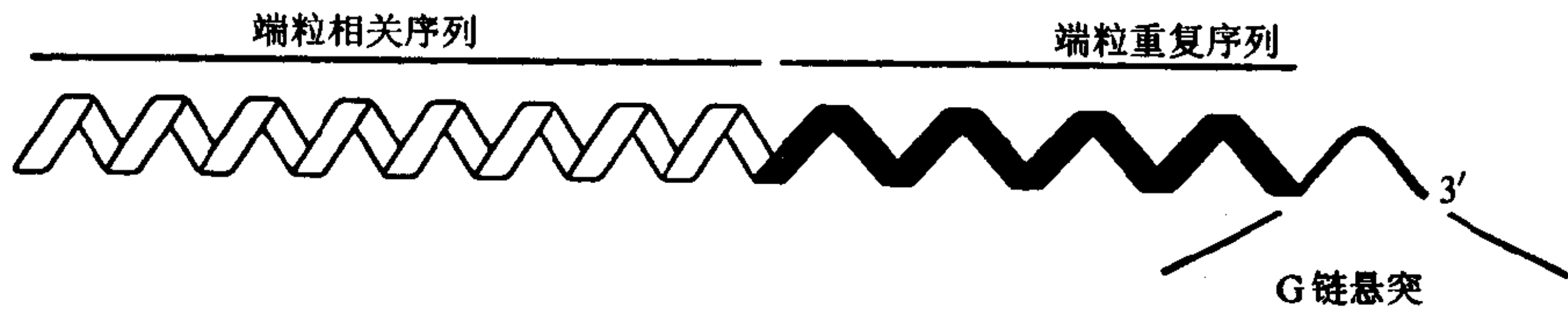


图 2-1 端粒 DNA 序列排列示意图

端粒相关序列(telomere-associated sequence, TAS)含有大量的重复序列元件。端粒重复序列(telomere repeat)一般都很小,为相对比较简单重复元件,但也具有明显的例外情况,例如,黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)。人们已经证明有些生物体内具有 G 链悬突,并认为是端粒普遍存在的保守特征。

的,可以推测,它很可能具有很重要的功能。除测定端粒序列外,Blackburn 和 Gall(1978)还揭示了四膜虫端粒重复序列中的 CCCCAG 链具有不连续性,这种不连续性的存在有助于我们对端粒进行标记研究,但其意义还不完全清楚。

后来,几个研究小组证明,采用化学方法可以直接分析某些物种的端粒序列(Katzen et al. 1981;Pluta et al. 1983;Price 1990)。其中某些生物体表现出明显不同于通常的端粒模糊带型的规则,即在这些生物体内端粒的长度是受严格调控的,这些生物包括下毛亚目的纤毛虫中的尖毛虫属和游仆虫属(*Euplotes*)。这些研究不仅揭示了纤毛虫的端粒序列,同时还证明了端粒并不是以平头末端终止。G 链由 Watson-Crick 端粒双股螺旋末端向外延伸形成含两个重复单位的 3' 端悬突。这一特征后来被证明具有种系发育的保守性(Henderson & Blackburn 1989),并且认为在体内对于端粒酶识别是很重要的(Greider 本书)。

人们通过与已知的端粒序列杂交,已经搞清大量的端粒序列(Moyzis et al. 1988)。但这样的方法很明显不能对趋异较大的端粒序列鉴别,而这些端粒很可能对于我们理解端粒的进化及其功能方面具有很大的意义。所以,为了获得多个物种的端粒序列,人们发明了更好的克隆方法。其中一种常用的办法是在稀释的条件下使非端粒限制片段连接成环状从而加以排除。由于端粒限制片段具有特殊的末端结构,因此不能形成环状分子而保持线状分子状态。剪切末端后,便可通过克隆进一步富集。这种富集方法的一个有力的补充是推定的端粒片段的功能测定(Szostak & Blackburn 1982)。这种方法首先将选取的限制片段连接到人工合成的酵母微型染色体(这种微型染色体须在两端各加上一个端粒以维持一种线性游离状态)的两个末端上。一般来说,这种克隆载体有一个功能性端粒。通过对不同的重组体筛选后,就可以筛选出具有功能的端粒序列。通过鉴定直接与端粒重复序列相连的基因组序列对 BAL 31 的敏感性,我们便可以确认出所分离出来的序列是否为端粒序列。鉴定端粒重复序列相邻序列对 BAL 31 的敏感性一定要在它们天然基因组位置上进行,因为内部端粒样序列的连接也会形成线性质粒的形式,这样的结构,如果置于末端的位置会具有端粒的功能。所以说,位置与功能鉴定相结合是确定端粒序列真实性的关键一步。我们可以从高等或低等真核细胞内,包括植物,用同样的方法获得端粒(Szostak & Blackburn 1982;Richards & Ausubel 1988;Brown 1989;Cross et al. 1989;Shampay & Blackburn 1989)。

端粒序列的组成

端粒可以分成两个结构功能区。一个为端粒重复双螺旋 DNA,有时含有不同的、密切相关的重复序列(Allshire et al. 1989)。另一个为端粒末端序列(见图 2-1)。由于来源不同,简单重复双螺旋 DNA 片段的长度范围在小于 50bp(原生动物游仆虫属)到大于 100kbp(鼠)之间。如上所述,G 链延伸到双螺旋 DNA 区域之外,形成 3' 悬突,长度为 2 个重复序列(Klobutcher et al. 1981;Pluta et al. 1982;Henderson & Blackburn 1989)。这样的结构只在少数(尽管有种系差异)物种中得到证实。除了双链 DNA 和悬突区域以外,直接与端粒重复序列相连的序列构成了第三个结构区域,可能与端粒的功能有关,称为端粒相关序列(telomere-associated sequence, TAS)(见图 2-1)。这些序列在种内和种间具有

很大的差异。

有趣的是,有些情况下,种系差别很大的物种间存在完全相同的端粒重复序列(例如人和锥虫),而在有些情况下,共有序列又具有很大的趋异性。最突出的例子就是果蝇,其端粒的序列中含有 HeT-A 和 TART 元件,与在转座元件中所发现的类似(Pardue 本书)。只有在对大量生物体端粒序列鉴定后,我们才能完全理解端粒结构的多样性。事实上,最近在白假丝酵母(*Candida albicans*)和一些相关物种中进行了重复序列鉴定(McEachern & Hicks 1993; McEachern & Blackburn 1994),均表明物种间可能存在端粒进化的连续性。果蝇的端粒序列具有极大的变异性,而不只是一种单一的形式(Levis 1993; Levis et al. 1993)。

端粒双链 DNA 结构

到目前为止,我们还没能用传统的方法(如 NMR, X 射线衍射晶体分析技术)得到高分辨率的简单端粒重复序列的双链螺旋结构,但有很多的迹象表明端粒双链结构具有独特的结构特征,这些特征常常与单独的富含 G 和富含 C 的链的结构特征密切相关。这两种链都可以形成分子内结构,赋予双链分子以独特的特性(例如对单链特异核酸酶的敏感性)。我们将在以后的章节中讨论与 C 链和(或)G 链结构有关的端粒双链 DNA 结构研究结果。在本节中,我们只讨论直接与端粒双链 DNA 结构有关的结构现象。

在低超螺旋条件下,计算端粒重复片段的螺旋周期(Henderson et al. 1988),所得的值与 B 型 DNA 结构没有明显区别(约 10.5bp/圈)。在这些实验中,选用多个在长度上只有几个碱基对差异的端粒重复序列克隆到完全相同的质粒中。用拓扑异构酶 I 处理上述质粒,然后检测拓扑异构体分布的变化,由于碱基对的不同完全可能测出它们电泳时的移动距离差别。通过所得的数据,便可以计算出克隆片段的螺旋周期(Wang 1979)。因此,在端粒重复序列中不可能有明显的结构异常情况。但是也有迹象表明,端粒双螺旋结构也有一些微小的异常,因为我们已经发现一些蛋白质能特异地识别某些端粒序列。例如在研究最深入的酵母中,多功能转录因子 RAP1 在体内与不规则端粒双链结构中一段序列结合。RAP1 表达过量或不足都会影响端粒长度的调节(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990; Kurtz & Shore 1991; Hardy et al. 1992),这些均说明 RAP1 可在体内与端粒结合(Zakian 本书; Shore 本书)。

对端粒染色质结构的研究进一步证明了端粒双链 DNA 中可能存在某些独特的结构特性。但是对不同类型端粒的研究得出了不同的结果。在具有非常短的(<100bp)、长度受严密调节的端粒的生物中,如下毛亚目的游仆虫属、尖毛虫属和棘尾虫属等,末端染色质结构为非核小体颗粒(Gottschling & Cech 1984; Gottschling & Zakian 1986; Price 1990; Fang & Cech 1991),这种颗粒在某些体系中被称为端体。在这些生物中,端体由 G 链悬突和相邻的结合一个或多个蛋白质的重复序列构成(Fang & Cech 本书)。在有些生物体内,如四膜虫和酵母,具有较长的端粒重复序列(一般大于 300bp),端粒双螺旋组装为非核小体型(Blackburn & Chiou 1981),但四膜虫的端粒 DNA 中也有 3%~10% 包装成空间窄小的核小体(P. Cohen & E. Blackburn 个人通讯),这与酵母中端粒相关序列相似(Wright et al. 1992)。在端粒很短的人类细胞,也有类似的情况(Tommerup et al.

1994)。然而,对于具有长端粒(>10kb)的细胞,如小鼠、大鼠和人的一些细胞,其端粒重复序列包装成传统的核小体形式(Makarov et al. 1993;Tommerup et al. 1994)。这些数据表明末端结构可能影响端粒的包装方式,但在很长的端粒中,这样的效应则会减弱,而大多包装可能属于核小体型。进一步讲,端粒 DNA 的包装方式并不具有种属特异性,而是可能与端粒本身的长度有关,因为在同一种属的不同细胞系中可以检测到核小体与非核小体两种类型的排列形式(Tommerup et al. 1994)。对于序列较长或长度可变的端粒,端体的限界难以确定。非常长的端粒在着丝粒近侧区常有简并的重复序列,这使得对端粒的重要功能部分作进一步描述复杂化。最近人们从中等长度或较长端粒的生物细胞内鉴定出端粒末端结合蛋白质的存在(Zhong et al. 1992;Cardenas et al. 1993;Sheng et al. 1994),表明一种特殊的加帽结构(与下毛亚目相似的端体)是端粒染色质保守的特征。所以,对端体的最佳描述还应包括那些与 G 链悬突以及直接与 G 悬突相连的双螺旋重复序列相结合的蛋白质。

端粒 DNA 所形成的新结构

如果除去蛋白质,天然的端粒在特定的离子浓度下可以结合在一起(Lipps et al. 1982;Oka & Thomas 1987;Acevedo et al. 1991)。这说明端粒重复序列具有形成特殊结构的能力。人们提出几个模型,企图解释端粒的结合现象。现在已经知道,是由 G 链悬突形成的独特结构介导了这一过程,详见下文(Sundquist & Klug 1989;Acevedo et al. 1991;Sen & Gilbert 1992;Sundquist & Heaphy 1993)。另一个能够证明端粒重复序列具有独特的结构特征的证据是在非变性的条件下,经 DNA 聚合酶 I 和 Klenow 片段的作用,与四膜虫端粒 G 链悬突互补的末端引物,能够通过端粒双螺旋继续延伸(Henderson et al. 1988)。在 Klenow 片段的存在下,延伸会在端粒/非端粒的交界处终止,表明这里存在双螺旋结构的变化。DNA 聚合酶 I 从引物杂交位点起始依靠切口平移手段,能够通过接点将引物继续延伸。由于 Klenow 片段缺乏 5'到 3'外切核酸酶和解旋酶活性,它的链置换和使引物通过含有 67%G/C 碱基对双螺旋的延伸能力很可能是由于在这些重复序列中存在链的滑移以及 G 链和 C 链能够形成不同的结构而造成的,而且一旦形成不同的结构,就会阻止 Watson-Crick 双螺旋结构的形成。

通过对端粒 G 链或 C 链合成的寡聚核苷酸的研究,我们对上述现象有了新的认识。发现其原因是 C 链(Ahmed & Henderson 1992;Gehring et al. 1993;Leroy et al. 1993;Ahmed et al. 1994)和 G 链(Henderson et al. 1987;Sen & Gilbert 1988;Sundquist & Klug 1989;Williamson et al. 1989;Laughlan et al. 1994)能够依靠自身配对,而不是依靠 Watson-Crick 互补碱基配对方式形成不同寻常的结构。

G 链结构

在系统发育差别很大的生物中,由于端粒末端的 G 链悬突具有保守性,所以人们开始研究端粒 G 链的结构(Klobutcher et al. 1981;Pluta et al. 1982;Henderson & Blackburn 1989)。很多的研究表明,端粒的 G 链序列,以及其他富含 G 的 DNA 和 RNA 序列,都可以形成分子内和分子间的四链结构(four-stranded structure),这种结构包含一种被

称为“G 四集体”(G-quartet)的基序(Williamson et al. 1989)。关于这种结构基序,曾在 20 年前有过描述(Guschlbauer et al. 1990),此结构为鸟嘌呤的平面排列方式,每个氢与邻近的两个原子形成氢键(见图 2-2)。由于 G 四集体的堆积,通过螯合作用产生笼样结构(chelation cage),适当体积的阳离子在其中结合。含有 G 四集体的 DNA 常被称为“G-DNA”。阳离子的结合明显地加强了 G-DNA 的稳定性。除了四链的结构外,还有报道认为端粒 G 链序列可以形成稳定的发卡样结构(Henderson et al. 1987; Balagurumoorthy et al. 1992; Choi & Choi 1994)。上述的观察结果使人们猜想到:这样的双链结构,可能与端粒 C 链一起形成三链体(triplex)。首先 G-G 双链可以和端粒酶 RNA 模板序列相互作用形成 DNA · DNA · RNA 三链体,此三链体参与端粒酶作用(Choi & Choi 1994);其次 G 链的尾部可以折叠到 Watson-Crick 双螺旋结构的末端,在端粒上形成三链体帽样的结构(Frank-Kamenetskii 1989)。如果综合在一起,这些理论上认为的三链体的形成与解链便成为一种开关,调节端粒的延长和端粒介导的末端保护。

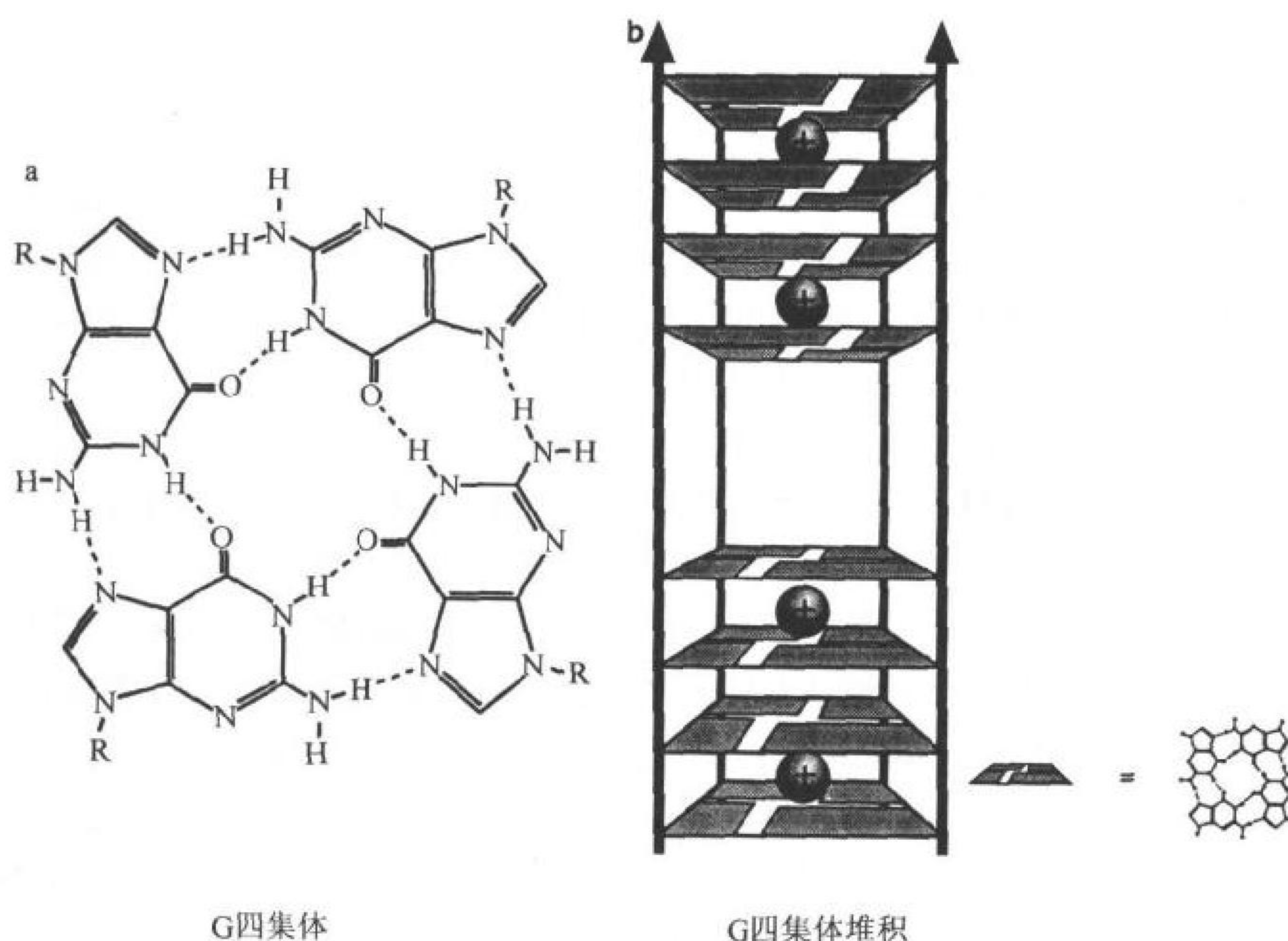


图 2-2

a. G 四集体:鸟嘌呤平面的四连体排列。每一个鸟嘌呤与相邻的两个鸟嘌呤配对。b. G 四集体可以堆积在一起形成四链结构。在这个结构家族中,结构类型很多,G-DNA 包括有平行、反平行、单体、二聚体和四聚体的形式(图中只列出一种)。G-DNA 的一个最常见的结构是阳离子在 G 四集体平面内或平面间通过与碱基伸出的羰基基团结合,形成了所谓的“阳离子笼”结构。

端粒序列形成的 G 链四螺旋有很多种形式,组成了一个相关结构的家族,包括单体四联体(Williamson et al. 1989)、发卡二聚体(Kang et al. 1992; Smith & Feigon 1992)和平行四联体(Aboul-ela et al. 1992; Laughlan et al. 1994)。主要的结构形式与阳离子环境和 DNA 的浓度有关。当然,其他的因素,如 pH 值和温度,也有一定的作用(Marsh & Henderson 1994)。各种结构处于动态平衡之中,改变这些条件就会发生结构的相互改变(Hardin et al. 1991)。现在有很多报道介绍了这些结构及其动力学性质,但是与端粒间

的关系仍不很明确。于是人们提出了 G-DNA 和 G-RNA 的生物学作用,支持上述某些观点的资料逐渐出现。一些研究表明,两个 G 链悬突间可以形成 G4-DNA,由此形成了端粒的结合 (Sundquist & Klug 1989; Sen & Gilbert 1990, 1992; Acevedo et al. 1991; Sundquist & Heaphy 1993)。与我们上面所述相一致,这解释了最早由 Lipps 等(1982)和 Oka 与 Thomas(1987)所观察到的一致结果,也提供了端粒之间在体内相互作用的可能机制。有人报道说,长端粒 G 链尾出现在酵母细胞周期的 S 期后期,线型的质粒可通过这些尾部的相互作用形成稳定的环,其原因很可能是形成了 G4-DNA (Wellinger et al. 1993),这有助于我们理解 Forte 和 Fangman(1979)的早期报道——端粒在它们的末端共价的交联在一起,因为 G4-DNA 在高浓度的甲酰胺作用下具有很强的抗变性能力 (Marsh & Henderson 1994)。Miura 和 Thomas(1994)基于动力学和平衡思想提出了一个新的模型,认为 G-DNA 介导的端粒结合,在 G-DNA 形成期,不需合成新的 G 链尾,但受 C 链替换的驱动。在他们之前还有一些类似的观点 (Sen & Gilbert 1988; Hardin et al. 1991, 1992)。

现在已经发现一些与 G-DNA 结合和(或)有利于 G-DNA 形成的蛋白质 (Chung et al. 1992; Walsh & Gualberto 1992; Fang & Cech 1993a, 1993b; Pearson et al. 1993; Weisman-Shomer & Fry 1993; Giraldo et al. 1994; Liu & Gilbert 1994; Schierer & Henderson 1994)。其中有两个最引人注意的和端粒有关的蛋白质是尖毛虫属尾体复合体的 β -亚基和 RAP1 (Fang & Cech 1993a, 1993b; Giraldo & Rhodes 1994)。Fang 和 Cech、Zakian 以及 Shore 在本书中对这些蛋白质进行了详细的介绍。一种酵母蛋白质,叫做 KEM1,后被鉴定为 G-DNA 核酸酶,对于减数分裂极为重要 (Liu & Gilbert 1994)。KEM1 突变会引起细胞在减数分裂 4N 期停止,这时 G4-DNA 的形成可能有利于染色体的配对 (pairing)。有关其他 G-DNA 结合蛋白质作用的发现,将有助于我们对这种端粒上或基因组上的此 DNA 形式的理解。

对于 G4-DNA 和(或)RNA 其他的功能,已有人进行了探讨和研究。有人用重复筛选和扩增的方法从体外大量的随机序列中选择出能与凝血酶结合的 G4-DNA 分子 (Wang et al. 1993; Schultze et al. 1994)。这表明 G-DNA 和其他特殊的核酸结构可能对药物设计非常有好处。有人提出,G4 结构域可能参与启动子功能的调节 (Lewis et al. 1988; Smith et al. 1989; Walsh & Gualberto 1992)、X 脆性位点结构异常 (Fry & Loeb 1994)、HIV RNA 基因组二聚体的形成 (Awang & Sen 1993; Sundquist & Heaphy 1993)、减数分裂染色体配对 (Sen & Gilbert 1988, 1990) 和重组的调节 (Pluta & Zakian 1989; Wang & Zakian 1990; Katinka & Bourgain 1992; Ashley & Ward 1993; Liu & Gilbert 1994)。随着我们对这一特殊结构认识的增加,我们很有可能会发现有关 G4-DNA/RNA 新的作用。

C 链结构

在早期的研究中,人们就端粒序列对单链核酸酶(S1)的敏感性进行了研究 (Budarf & Blackburn 1987)。四膜虫端粒序列 C 链在有扭转力作用时特别敏感。在这个较早的报道中,作者没有明确地说明 pH 是非常关键的因素。该实验是在 pH=4.5 (为 S1 消化的条件)的条件下进行的。在这样的条件下,胞嘧啶质子型化,并能参与 C · C⁺ 碱基配对。其他

的研究表明,在弱酸环境下,端粒序列的超螺旋结构会引起 H 型 DNA 的形成(Lyamichev et al. 1989),此 H 型 DNA 是一种三链的结构(Mirkin & Frank-Kamenetskii 1994)。最初人们认为,C 链形成了主干结构,里面含有 C · C⁺和 A · A⁺碱基配对,但后来的研究表明,正确的模型是三链(H 型)(Voloshin et al. 1992)。在这种结构中,富含 C 的链参与形成三链的第三个链。由于受到 G 链能够形成特殊的分子内结构的启发,有人提出,G 链在这些质粒中也形成同样的结构,使 DNA 含有两个新的结构基序,称为兼备性(eclectic)(Voloshin et al. 1992)。

最近有人描述了一种新的 DNA 结构形式,其中的两个双螺旋结构交错连接,形成了四链结构。这种双螺旋结构以 C · C⁺碱基配对,而形成了稳定的结构,该结构的形成要求有略带酸性的环境。这种结构基序被称为“i-基序”(见图 2-3)(Gehring et al. 1993; Leroy et al. 1993)。端粒的 C 链寡聚核苷酸能够形成分子内和分子间的 i-基序结构(Ahmed & Henderson 1992; Ahmed et al. 1994)。尽管有人探讨了 i-基序 DNA 在端粒中可能的作用(Ahmed et al. 1994),但还没有人在体内找到这种结构存在的迹象。

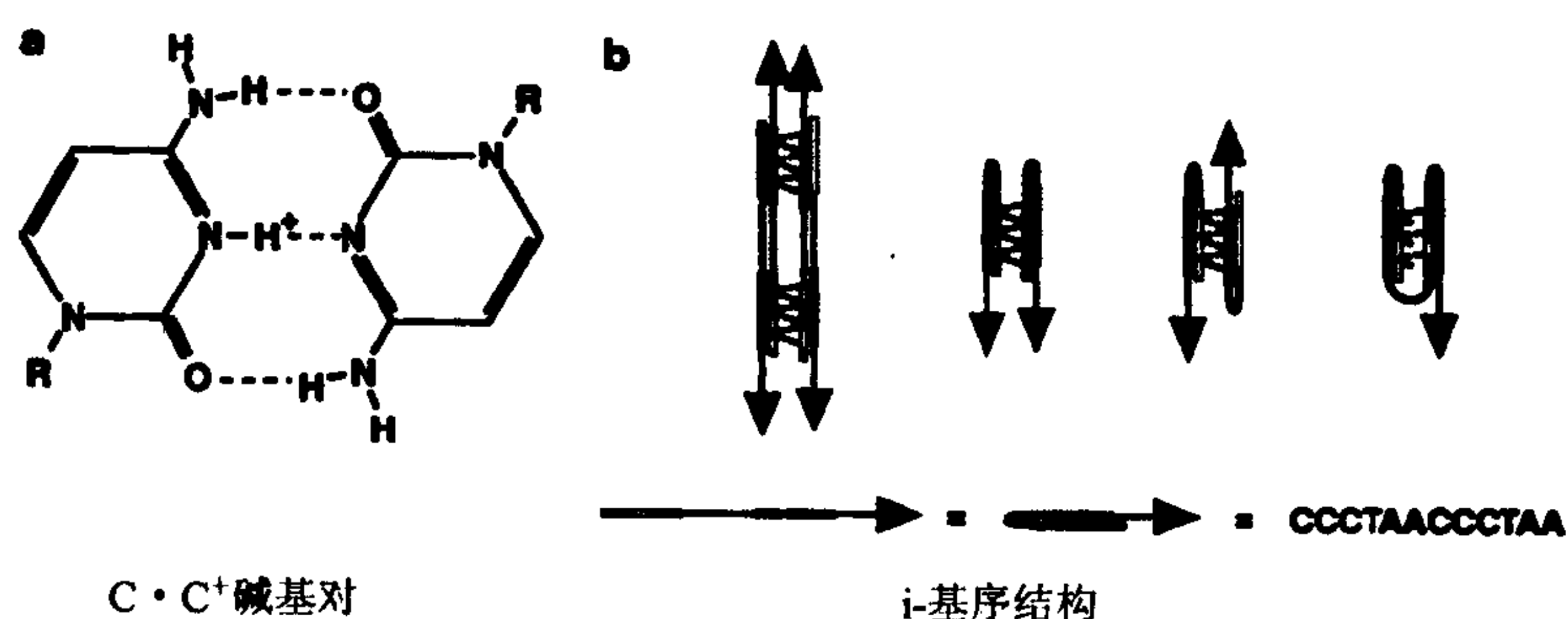


图 2-3

a. C · C⁺碱基对可以介导插入(i-基序) DNA 的形成。碱基对的形成一定需要胞嘧啶的质子型,所以 i-基序结构的形成依赖于 pH 值。b. 人的 C 链端粒序列 CCCTAA 形成单体、二聚体和四聚体的 i-基序结构模式(Ahmed et al. 1994)。

端粒相关序列

在很多的生物体内,端粒重复序列附近的 DNA 序列都含有复杂的重复基序,叫做亚端粒或端粒相关序列(TAS)。本书中有几章讨论了不同生物体内的 TAS,在此我们只对 TAS 的一般特性作一介绍。

亚端粒结构域是可变的。染色体在这一区域中含有重复基序并具有多态性,可以直接反映出这段染色体的可塑性。我们可以把亚端粒结构域看作是缓冲区,可以将末端的特殊结构域与内部的区域区分开来。但是,由于基因组在这个区域可变,也可以把它看作“试验区”(test zone),因为任何这个区域的基因常会发生相对快速的重新定位,和(或)通过重组发生变异。

在一些生物中,TAS 具有高度的变异性,而在有些生物体内,TAS 又受到严格的限制。现在人们已经提出一些 TAS 的可能作用。在原生生物纤毛虫中的棘毛虫属中,TAS

含有几个保守序列,包括两个短的反向重复序列,一个是 10bp 的共有序列,另一些是变化很大的回文序列(Maercker & Lipps 1993)。现在已经有人提出,在棘毛虫巨核发育中,这些序列的构成涉及基因的切除(Maercker & Lipps 1993;Blackburn 本书)。与许多纤毛虫一样,棘毛虫巨核从种系微核发育而来。在这一过程中,常规的、大的染色体,在微核中被处理成很多较小的染色体,有时只有一个基因大小(Klobutcher et al. 1981;Lipps et al. 1982)。于是人们提出,棘毛虫微核中的序列(这些序列在巨核中形成亚端粒结构)参与同源重组形成 loop 结构,loop 结构通过结构专一性的内切核酸酶处理,释放出 loop 区域内的基因。在其他纤毛虫中发现 TAS 是独特的,但他们的功能尚需进一步研究。

在酵母中,亚端粒共有两个重复元件,称为 X 和 Y'(Chan & Tye 1983)。X(0.3~3.75kb)比 Y'(5.2kb 和 6.7kb)保守程度低(Chan & Tye 1983;Zakian & Blanton 1988;Biessmann & Mason 1992)。见于端粒中不规则的重复序列,也同样存在于 Y'元件和 X 元件以及 Y'元件和 Y'元件之间。一种解释认为,Y'元件可以看作是镶嵌在近端的端粒重复序列中。Y'元件间的重组发生频繁,结果会导致显著的端粒多态现象(端粒酶作用引起的长度变化除外)。Y'元件含有可转录的可读框(open reading frame,ORF)。由于 Y'元件与可移动遗传元件具有弱序列同源性(weak sequence homology),人们提出 Y'元件来自于祖先酵母基因组的单一插入序列,而后来在基因组周围的移动是由于重组所造成的(Louis & Haber 1992;Louis et al. 1994;Zakian 本书)。

在很多野生型的酵母株中,Y'重复序列出现在很多但不是所有的端粒中。缺乏这种元件的染色体末端是稳定的。因此,实现正常的端粒功能并不必需这种元件。但在端粒-长度-调控突变体中(*est1*)(Lundblad & Szostak 1989;Lundblad & Blackburn 1990),确有由于端粒的丢失,而出现大量细胞死亡的现象,但还有部分细胞存活。在这些细胞中,Y' TAS 元件或者其缺失序列的衍生物,可以通过 RAD 52 重组依赖途径定位于每个端粒上。这表明这些元件间的重组足以维持端粒,而且很可能是在没有端粒酶活性条件下实现的(Lundblad & Blackburn 1993)。

寄生性的恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的亚端粒区,具有高度的多态性。同源染色体中的变化范围很大,介于 50kb 到 300kb 之间(de Bruin et al. 1994)。目前所测定出的重复序列命名为 R-FA3、REP 20、R-1A2 和 R-CG7。目前认为,这些重复序列在亚端粒结构域的出现,增加了该部位的重组,由此,可能增加末端基因的遗传多样性。另外,频繁的断裂及亚端粒基因上新端粒的添加也发生在这种生物体内(Scherf & Mattei 1992)。这样,亚端粒动力学机制会在不同的选择条件下,提供给特定寄生虫亚群很大的优越性(Ponzi et al. 1992;de Bruin et al. 1994)。

在盘基网柄菌属(*Dictyostelium*)中发现了位于特殊端粒重复序列附近的一种 29bp TAS 的重复序列(Emery & Weiner 1981)。同样,在绒泡菌属(*Physarum*)中也测定出亚端粒重复序列(Bergold et al. 1983)。真菌病原菌分枝孢子菌(*Cladosporium fulvum*)在非端粒位置,含有额外拷贝的亚端粒重复序列,其中含有的一些序列与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)自主复制序列(autonomously replicating sequence,ARS)类似(Coleman et al. 1993)。

人类基因组含有几种亚端粒重复序列。在性染色体的伪染色体区(pseudoautosomal region,PAR)有一个 2.6Mbp 的区域,参与粗线期的染色体配对(Cooke et al. 1985;

Biessmann & Mason 1992)。这是一个非常复杂的区域,常含有 CpG 重复序列岛。很多功能基因可能就定位在 PAR 之内,这与一些酵母端粒情况相同(Carlson et al. 1985; Michels et al. 1992),但这种可能性还需要进一步的证实。很多的实验已证实常染色体亚端粒重复序列的存在。基于着丝粒-远端单拷贝基因在一些人染色体上的位置,亚端粒重复序列的最大长度应该在几百 kb 的水平上(Burmeister et al. 1991; Wilkie et al. 1991)。一种亚端粒散在分布的重复序列(subtelomeric interspersed repeat, STIR)已经被测定出来,并且被鉴定(Simmler et al. 1985; Petit et al. 1990; Rouyer et al. 1990)。这种重复序列长约 350bp,其核心部分为 270bp,该序列在伪常染色体拷贝间具有 80%的同源性,在常染色体拷贝间有 55%~70%的同源性。STIR 还存在于端粒附近基因的非编码区。Brown 和他的同事们在第 7 号染色体的亚末端区中测定出三个重复基序,其长度为 61bp、29bp 和约 37bp。有约 22 个不同的端粒中含有这些重复序列(Brown et al. 1990)。Weber 和他的同事测定出一种亚端粒重复序列,存在于 14 个不同的染色体末端(Weber et al. 1990, 1991),他们还发现了散布的单端粒 TTAGGG 重复序列簇,还认为这些序列代表了末端重复序列和亚端粒区之间的界限。Cheng 等(1991)已经描述了一个亚端粒重复序列,叫做 HST。这个重复序列的长度为 3.6kb 以上,含有一个保守的 CpG 区。根据基因组杂交实验,HST 可以分为两个大的片段。在多个基因组位点都发现了 HST 重复序列的远端部分(Cheng et al. 1991)。在 HST 内有 61bp、46bp 和 28bp 的重复元件,一个富含 AT 的区域和一个富含 CG 的区域。HST 的重复序列和 de Lange 等(1990)测出的序列间同源水平达到 86%。近期的研究还表明,亚端粒重复序列区含有的大量限制片段多态性,在体细胞内出现很大程度上的甲基化现象(de Lange et al. 1990)。Cross 等(1989)测定出亚末端重复序列存在于很多的染色体末端和一些内部的区域。最终,Royle 和他的同事利用引物延伸/PCR 方法,测定出 8 个不同类别的亚端粒序列(Royle et al. 1992)。

在一些植物中已经测定出一些亚端粒重复序列的存在,包括大麦(Kilian & Kleinhofs 1992)、黑麦(Bedbrook et al. 1980)和番茄(Broun et al. 1992)。对这些序列的描述同动物的序列相比较还不够深入(Richards 本书)。

亚端粒基因

有一些情况是整个基因盒或其一部分定位于染色体内部和亚端粒两个部位。MAL 和 SUC 基因位点都是多基因,其拷贝位于一些而不是所有的端粒上(Carlson et al. 1985; Michels et al. 1992)。另一种情况是,锥虫具活性的表面糖蛋白(variant surface glycoprotein, VSG)基因在端粒部位表达,称做表达位点。这些基因的端粒定位,可能与基因表达偶联。这样,表面抗原表达的变化有一部分是由另一个变异体替代端粒表达位点上的活化基因所致,这与把亚端粒看作测试区的观点是一致的(Kooter et al. 1987; Crozatier et al. 1990; Zomerdijs et al. 1991, 1993)。另一个位于端粒部位的基因的例子是贾第虫属(*Giardia*)的 rDNA,通过比较不同的提取物,发现它可以在染色体间移动,但局限于端粒部位(Adam et al. 1991)。这些数据表明,与端粒相关的基因都服从于与酵母中 X 和 Y' 元件相同的动力学现象。而且鉴于它们位于末端端粒重复序列附近,也可以把它们称为 TAS。从本质上讲,任何位于亚端粒的基因,或者是移入亚端粒的基因都是 TAS,都会表

现出 TAS 的特性,例如有移动性,并且通过重组途径实现变异。

内部端粒序列

端粒重复序列常在染色体的内部发现。这些重复序列叫做内部端粒序列(Park et al. 1992),可能产生于进化过程中,经末端端粒序列融合而生成(Ijdo et al. 1991)。在有些情况下,人们这样认为,内部端粒来自于带有端粒的元件整合到染色体中(Stoll et al. 1993)。某些内部重复序列的侧翼序列结构表明,它们是通过转座产生的(Cherry & Blackburn 1985)。一个内部端粒重复序列的增殖模型就涉及到了在重复序列内部的瞬时断裂部位有端粒酶的作用(Regad et al. 1994)。无论内部重复序列来自于什么地方都是重组的热点(Park et al. 1992; Rossi et al. 1993)。

总结

对于端粒 DNA 的一些特性,尽管我们了解了很多,但这些特性是否与端粒的功能有关,以及如何发挥作用的,我们还了解甚少。端粒双螺旋 DNA 特异地被蛋白质识别,很易在染色体末端形成核酸/蛋白质复合物,并具有特异的功能属性。端粒双螺旋的一些特性实际上是每个链具有形成稳定的分子内结构能力的结果。因此,端粒双螺旋是一种特殊染色体区域,具有持续的结构变化的能力,并根据细胞的需求而得到调节。为了充分理解在端粒功能中 DNA 结构的作用,需要进一步研究端粒序列结构的特殊行为和这些结构与端粒蛋白的相互作用关系。

致谢

感谢端粒委员会委员,特别感谢本书的编辑们,在本章的撰写过程中,为我们提供了大量的信息和指导。

参考文献

- Aboul-ela, F., A.I.H. Murchie, and D.M.J. Lilley. 1992. NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG₄T). *Nature* **360**: 280–282.
- Acevedo, O.L., L.A. Dickinson, T.J. Macke, and C.A. Thomas. 1991. The coherence of synthetic telomeres. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3409–3419.
- Adam, R.D., T.E. Nash, and T.E. Wellems. 1991. Telomeric location of *Giardia* rDNA genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3326–30.
- Ahmed, S. and E. Henderson. 1992. Formation of novel hairpin structures by telomeric C-strand oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 507–511.
- Ahmed, S., A. Kintinar, and E. Henderson. 1994. Human telomeric C-strand tetraplexes. *Nature Struct. Biol.* **1**: 83–88.
- Allshire, R.C., M. Dempster, and N.D. Hastie. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4611–4627.

- Ashley, T. and D.C. Ward. 1993. A "hot-spot" of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. *Cytogenet. Cell Genet.* **62**: 169-171.
- Awang, G. and D. Sen. 1993. Mode of dimerization of HIV-1 genomic RNA. *Biochemistry* **32**: 11453-11457.
- Balagurumoorthy, P., S.K. Brahmachari, D. Mohanty, M. Bansal, and V. Sasisekharan. 1992. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4061-4067.
- Bedbrook, J.R., J. Jones, J. O'Dell, M. Thompson, and R.B. Flavell. 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* **19**: 545-560.
- Bergold, P.J., G.R. Campbell, V.C. Littau, and E.M. Johnson. 1983. Sequence and hairpin structure of an inverted repeat series at termini of the *Physarum* extrachromosomal rDNA molecule. *Cell* **32**: 1287-1299.
- Biessmann, H. and J.M. Mason. 1992. Genetics and molecular biology of telomeres. *Adv. Genet.* **30**: 185-249.
- Blackburn, E.H. and P.B. Challoner. 1984. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **36**: 447-457.
- Blackburn, E.H. and S. Chiou. 1981. Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for the rRNA of *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 2263-2267.
- Blackburn, E.H. and J. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* **120**: 33-53.
- Broun, P., M.W. Ganai, and S.D. Tanksley. 1992. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 1354-1357.
- Brown, W.R. 1989. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* **338**: 774-776.
- Brown, W.R., P.J. MacKinnon, A. Villasante, N. Spurr, V.J. Buckle, and M.J. Dobson. 1990. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* **63**: 119-132.
- Budarf, M.L. and E.H. Blackburn. 1987. S1 nuclease sensitivity of double stranded telomeric DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**: 6273-6292.
- Burmeister, M., S. Kim, E.R. Price, T. de Lange, U. Tantravahi, R.M. Myers, and D.R. Cox. 1991. A map of the distal region of the long arm of human chromosome 21 constructed by radiation hybrid mapping and pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics* **9**: 19-30.
- Cangiano, G. and A. La Volpe. 1993. Repetitive DNA sequences located in the terminal portion of the *Caenorhabditis elegans* chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1133-1139.
- Cardenas, M.E., A. Bianchi, and T. de Lange. 1993. A *Xenopus* egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. *Genes Dev.* **7**: 883-894.
- Carlson, M., J.L. Celenza, and F.J. Eng. 1985. Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2894-2902.
- Chan, C.S. and B.K. Tye. 1983. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**: 563-573.
- Cheng, J.F., C.L. Smith, and C.R. Cantor. 1991. Structural and transcriptional analysis of a human subtelomeric repeat. *Nucleic Acids Res.* **19**: 149-154.
- Cherry, J.M. and E.H. Blackburn. 1985. The internally located telomeric sequences in the germ-line chromosomes of *Tetrahymena* are at the ends of transposon-like elements. *Cell* **43**: 747-753.
- Choi, K.H. and B.S. Choi. 1994. Formation of a hairpin structure by telomere 3' overhang. *Biochim. Biophys. Acta.* **1217**: 341-344.

- Chung, I.K., V.B. Mehta, J.R. Spitzner, and M.T. Muller. 1992. Eukaryotic topoisomerase II cleavage of parallel stranded DNA tetraplexes. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1973–1977.
- Coleman, M.J., M.T. McHale, J. Arnau, A. Watson, and R.P. Oliver. 1993. Cloning and characterisation of telomeric DNA from *Cladosporium fulvum*. *Gene* **132**: 67–73.
- Conrad, M.N., J.H. Wright, A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: Overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**: 739–750.
- Cooke, H.J., W.R. Brown, and G.A. Rappold. 1985. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature* **317**: 687–692.
- Cross, S.H., R.C. Allshire, S.J. McKay, N.I. McGill, and H.J. Cooke. 1989. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* **338**: 771–774.
- Crozatier, M., L.H. Van der Ploeg, P.J. Johnson, J. Gommers-Ampt, and P. Borst. 1990. Structure of a telomeric expression site for variant specific surface antigens in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 1–12.
- de Bruin, D., M. Lanzer, and J.V. Ravetch. 1994. The polymorphic subtelomeric regions of *Plasmodium falciparum* chromosomes contain arrays of repetitive sequence elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 619–623.
- de Lange, T., L. Shiue, R.M. Myers, D.R. Cox, S.L. Naylor, A.M. Killery, and H.E. Varmus. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 518–527.
- Edman, J.C. 1992. Isolation of telomerelike sequences from *Cryptococcus neoformans* and their use in high-efficiency transformation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2777–2783.
- Emery, H.S. and A.M. Weiner. 1981. An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in *Dictyostelium discoideum*. *Cell* **26**: 411–419.
- Fang, G.W. and T.R. Cech. 1991. Molecular cloning of telomere-binding protein genes from *Stylonychia mytilis*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5515–5518.
- . 1993a. Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the beta-subunit of the *Oxytricha* telomere-binding protein. *Biochemistry* **32**: 11646–11657.
- . 1993b. The β subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* **74**: 875–885.
- Forney, J.D. and E.H. Blackburn. 1988. Developmentally controlled telomere addition in wild type and mutant paramecia. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 251–258.
- Forney, J., E.R. Henderson, and E.H. Blackburn. 1987. Identification of the telomeric sequence of the acellular slime molds *Didymium iridis* and *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res.* **14**: 9143–9151.
- Forte, M.A. and W.L. Fangman. 1979. Yeast chromosomal DNA molecules have strands which are cross-linked at their termini. *Chromosoma* **72**: 151–155.
- Frank-Kamenetskii, M. 1989. DNA structure. The turn of the quadruplex? *Nature* **342**: 737.
- Fry, M. and L.A. Loeb. 1994. The fragile X syndrome d(CGG)_n nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 4950–4954.
- Ganal, M.W., N.L. Lapitan, and S.D. Tanksley. 1991. Macrostructure of the tomato telomeres. *Plant Cell* **3**: 87–94.
- Gehring, K., J.-L. Leroy, and M. Gueron. 1993. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **363**: 561–565.
- Giraldo, R. and D. Rhodes. 1994. The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA. *EMBO J.* **13**: 2411–2420.
- Giraldo, R., M. Suzuki, L. Chapman, and D. Rhodes. 1994. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: A circular dichroism study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 7658–7662.
- Gottschling, D.E. and T.R. Cech. 1984. Chromatin structure of the molecular ends of

- Oxytricha* macronuclear DNA: Phased nucleosomes and a telomeric complex. *Cell* 38: 501-510.
- Gottschling, D.E. and V.A. Zakian. 1986. Telomere proteins: Specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* 47: 195-205.
- Guschlbauer, W., J.-F. Chantot, and D. Thiele. 1990. Four-stranded nucleic acid structures 25 years later: From guanosine gels to telomere DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 8: 491-511.
- Hardin, C.C., E. Henderson, T. Watson, and J.K. Prosser. 1991. Monovalent cation-induced structural transitions in telomeric DNAs: G-DNA folding intermediates. *Biochemistry* 30: 4460-4472.
- Hardin, C.C., T. Watson, M. Corregan, and C. Bailey. 1992. Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* 31: 833-841.
- Hardy, C., L. Sussel, and D. Shore. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6: 801-814.
- Henderson, E. and E.H. Blackburn. 1989. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 9: 345-348.
- Henderson, E., C.C. Hardin, S.K. Walk, I.J. Tinoco, and E.H. Blackburn. 1987. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* 51: 899-908.
- Henderson, E.H., D. Larson, W. Melton, J. Shampay, E. Spangler, C. Greider, T. Ryan, and E. Blackburn. 1988. Structure, synthesis, and regulation of telomeres. *Cancer Cells* 6: 453-461.
- Iido, J.W., A. Baldini, D.C. Ward, S.T. Reeders, and R.A. Wells. 1991. Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9051-9055.
- Javerzat, J.P., V. Bhattacharjee, and C. Barreau. 1993. Isolation of telomeric DNA from the filamentous fungus *Podospira anserina* and construction of a self-replicating linear plasmid showing high transformation frequency. *Nucleic Acids Res* 21: 497-504.
- Kang, C.H., X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, and A. Rich. 1992. Crystal structure of four-stranded *Oxytricha* telomeric DNA. *Nature* 356: 126-131.
- Katinka, M.D. and F.M. Bourgain. 1992. Interstitial telomeres are hotspots for illegitimate recombination with DNA molecules injected into the macronucleus of *Paramecium primaurelia*. *EMBO J.* 11: 725-732.
- Katzen, A.L., G.M. Cann, and E.H. Blackburn. 1981. Sequence-specific fragmentation of macronuclear DNA in a holotrichous ciliate. *Cell* 24: 313-320.
- Kilian, A. and A. Kleinhofs. 1992. Cloning and mapping of telomere-associated sequences from *Hordeum vulgare* L. *Mol. Gen. Genet.* 235: 153-156.
- Kipling, D. and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347: 400-402.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3015-3019.
- Kooter, J.M., H.J. van der Spek, R. Wagter, C.E. d'Oliveira, F. van der Hoeven, P.J. Johnson, and P. Borst. 1987. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *T. brucei*. *Cell* 51: 261-272.
- Kurtz, S. and D. Shore. 1991. RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast. *Genes Dev.* 5: 616-628.
- Laughlan, G., A.I.H. Murchie, D.G. Norman, M.H. Moore, P.C.E. Moody, D.M. Lilley, and B. Luisi. 1994. The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science* 265: 520-524.
- Le Blancq, S.M., R.S. Kase, and L.H. Van der Ploeg. 1991. Analysis of a *Giardia lamblia* rRNA encoding telomere with [TAGGG]_n as the telomere repeat. *Nucleic Acids Res.* 19: 5790.

- Leroy, J.-L., K. Gehring, A. Kettani, and M. Gueron. 1993. Acid multimers of oligodeoxycytidine strands: Stoichiometry, base-pair characterization and proton exchange properties. *Biochemistry* **32**: 6019–6031.
- Levis, R.W. 1993. *Drosophila melanogaster* does not share the telomeric repeat sequence of another invertebrate, *Ascaris lumbricoides*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 440–442.
- Levis, R.W., R. Ganesan, K. Houtchens, L.A. Tolar, and F.M. Sheen. 1993. Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell* **75**: 1083–1093.
- Lewis, C.D., S.P. Clark, G. Felsenfeld, and H. Gould. 1988. An erythrocyte-specific protein that binds to the poly (dG) region of the chicken B-globin gene promoter. *Genes Dev.* **2**: 863–873.
- Lipps, H.J., W. Gruissem, and D.M. Prescott. 1982. Higher order DNA structure in macronuclear chromatin of the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 2495–2499.
- Liu, Z. and W. Gilbert. 1994. The yeast KEM1 gene encodes a nuclease specific for G4 tetraplex DNA: Implication of in vivo functions for this novel DNA structure. *Cell* **77**: 1083–1092.
- Louis, E.J. and J.E. Haber. 1992. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**: 559–574.
- Louis, E.J., E.S. Naumova, A. Lee, G. Naumov, and J.E. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: Its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* **136**: 789–802.
- Lundblad, V. and E.H. Blackburn. 1990. RNA-dependent polymerase motifs in EST1: Tentative identification of a protein component of an essential yeast telomerase (letter). *Cell* **60**: 529–530.
- . 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1⁻ senescence. *Cell* **73**: 347–360.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633–643.
- Lustig, A.J., S. Kurtz, and D. Shore. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* **250**: 549–553.
- Lyamichev, V.I., S.M. Mirkin, O.N. Danilevskaya, O.N. Voloshin, S.V. Balatskaya, V.N. Dobrynin, S.A. Filippov, and M.D. Frank-Kamenetskii. 1989. An unusual DNA structure detected in a telomeric sequence under superhelical stress and at low pH. *Nature* **339**: 634–637.
- Maercker, C. and H.J. Lipps. 1993. Analysis of the subtelomeric regions of macronuclear gene-sized DNA molecules of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*: Implications for the DNA fragmentation process during macronuclear development? *Dev. Genet.* **14**: 378–384.
- Makarov, V.L., S. Lejnine, J. Bedoyan, and J.P. Langmore. 1993. Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* **73**: 775–787.
- Marsh, T.C. and E. Henderson. 1994. G-wires: Self-assembly of a telomeric oligonucleotide, d(GGGGTTGGGG), into large superstructures. *Biochemistry* **33**: 10718–10724.
- McEachern, M.J. and E.H. Blackburn. 1994. A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 3453–3457.
- McEachern, M.J. and J.B. Hicks. 1993. Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 551–560.
- Michels, C.A., E. Read, K. Nat, and M.J. Charron. 1992. The telomere-associated MAL3 locus of *Saccharomyces* is a tandem array of repeated genes. *Yeast* **8**: 655–665.
- Mirkin, S.M. and M.D. Frank-Kamenetskii. 1994. H-DNA and related structures. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 541–576.
- Miura, T. and G.J. Thomas, Jr. 1994. Structural polymorphism of telomere DNA: Inter-quadruplex and duplex-quadruplex conversions probed by raman spectroscopy.

- Biochemistry* 33: 7848-7856.
- Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, and J.-R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6622-6626.
- Mueller, F., C. Wicky, A. Spicher, and H. Tobler. 1991. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell* 67: 815-822.
- Oka, Y. and C.A. Thomas. 1987. The cohering telomeres of *Oxytricha*. *Nucleic Acids Res.* 15: 8877-8898.
- Okazaki, S., K. Tsuchida, H. Maekawa, H. Ishikawa, and H. Fujiwara. 1993. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1424-1432.
- Park, V.M., K.M. Gustashaw, and T.M. Wathen. 1992. The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosome abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 914-923.
- Pearson, A.M., A. Rich, and M. Krieger. 1993. Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices. *J. Biol. Chem.* 268: 3546-3554.
- Petit, C., J. Levilliers, and J. Weissenbach. 1990. Long-range restriction map of the terminal part of the short arm of the human X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3680-3684.
- Petracek, M.E., P.A. Lefebvre, C.D. Silflow, and J. Berman. 1990. *Chlamydomonas* telomere sequences are A+T-rich but contain three consecutive G-C base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8222-8226.
- Pluta, A.F. and V.A. Zakian. 1989. Recombination occurs during telomere formation in yeast. *Nature* 337: 429-433.
- Pluta, A.F., B.P. Kaine, and B.B. Spear. 1982. The terminal organization of macronuclear DNA in *Oxytricha fallax*. *Nucleic Acids Res.* 10: 8145-8154.
- Ponzi, M., T. Pace, E. Dore, and C. Frontali. 1985. Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei*. *EMBO J.* 4: 2991-2995.
- Ponzi, M., T. Pace, E. Dore, L. Picci, E. Pizzi, and C. Frontali. 1992. Extensive turnover of telomeric DNA at a *Plasmodium berghei* chromosomal extremity marked by a rare recombinational event. *Nucleic Acids Res.* 20: 4491-4497.
- Price, C.M. 1990. Telomere structure in *Euplotes crassus*: Characterization of DNA-protein interactions and isolation of a telomere-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3421-3431.
- Regad, F., M. Lebas, and B. Lescure. 1994. Interstitial telomeric repeats within the *Arabidopsis thaliana* genome. *J. Mol. Biol.* 239: 163-169.
- Richards, E.R. and F.M. Ausubel. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53: 127-136.
- Rossi, E., G. Floridia, M. Casali, C. Danesino, G. Chiumello, F. Bernardi, I. Magnani, L. Papi, M. Mura, and O. Zuffardi. 1993. Types, stability, and phenotypic consequences of chromosome rearrangements leading to interstitial telomeric sequences. *J. Med. Genet.* 30: 926-931.
- Rouyer, F., A. de la Chapelle, M. Andersson, and J. Weissenbach. 1990. An interspersed repeated sequence specific for human subtelomeric regions. *EMBO J.* 9: 505-514.
- Royle, N.J., M.C. Hill, and A.J. Jeffreys. 1992. Isolation of telomere junction fragments by anchored polymerase chain reaction. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 247: 57-67.
- Schechtman, M.G. 1990. Characterization of telomere DNA from *Neurospora crassa*. *Gene* 88: 159-165.
- Scherf, A. and D. Mattei. 1992. Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*: Breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes. *Nucleic Acids Res.* 20: 1491-1496.

- Schierer, T. and E. Henderson. 1994. A protein from *Tetrahymena thermophila* that specifically binds parallel-stranded G4-DNA. *Biochemistry* 33: 2240–2246.
- Schultze, P., R.F. Macaya, and J. Feigon. 1994. Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J. Mol. Biol.* 235: 1532–1547.
- Sen, D. and W. Gilbert. 1988. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334: 364–366.
- . 1990. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* 344: 410–414.
- . 1992. Novel DNA superstructures formed by telomere-like oligomers. *Biochemistry* 31: 65–70.
- Shampay, J. and E.H. Blackburn. 1989. *Tetrahymena* micronuclear sequences that function as telomeres in yeast. *Nucleic Acids Res.* 17: P3247–P3260.
- Shampay, J., J.W. Szostak, and E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154–157.
- Sheng, H., Z. Hou, T. Schierer, D.L. Dobbs, and E. Henderson. 1994. Identification and characterization of a putative telomere binding protein from *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1144–1153.
- Simmler, M.C., F. Rouyer, G. Vergnaud, L.M. Nystrom, K.Y. Ngo, A. de la Chapelle, and J. Weissenbach. 1985. Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature* 317: 692–697.
- Smith, F.W. and J. Feigon. 1992. Quadruplex structure of *Oxytricha* telomeric DNA oligonucleotides. *Nature* 356: 164–168.
- Smith, S.S., D.J. Baker, and L.A. Jardines. 1989. A G4-DNA/B-DNA junction at codon 12 of c-Ha-ras is actively and asymmetrically methylated by DNA (cytosine-5) methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1397–1402.
- Starling, J.A., J. Maule, N.D. Hastie, and R.C. Allshire. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res.* 18: 6881–6888.
- Stoll, S., T. Zirlik, C. Maercker, and H.J. Lipps. 1993. The organization of internal telomeric repeats in the polytene chromosomes of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. *Nucleic Acids Res.* 21: 1783–1788.
- Sugawara, N. and J.W. Szostak. 1986. Telomeres of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* (Suppl.) 1: S373.
- Sundquist, W.I. and S. Heaphy. 1993. Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3393–3397.
- Sundquist, W.I. and A. Klug. 1989. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342: 825–829.
- Szostak, J.W. and E.H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245–255.
- Teschke, C., G. Solleder, and K.B. Moritz. 1991. The highly variable pentameric repeats of the AT-rich germline limited DNA in *Parascaris univalens* are the telomeric repeats of somatic chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 2677–2684.
- Tommerup, H., A. Dousmanis, and T. de Lange. 1994. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5777–5785.
- Voloshin, O.N., A.G. Veselkov, B.P. Belotserkovskii, O.N. Danilevskaya, M.N. Pavlova, V.N. Dobrynin, and M.D. Frank-Kamenetskii. 1992. An eclectic DNA structure adopted by human telomeric sequence under superhelical stress and low pH. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9: 643–652.
- Walsh, K. and A. Gualberto. 1992. MyoD binds to the guanine tetrad nucleic acid structure. *J. Biol. Chem.* 267: 13714–13718.
- Wang, J.C. 1979. Helical repeat of DNA in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 200–203.
- Wang, K.Y., S. McCurdy, R.G. Shea, S. Swaminathan, and P.H. Bolton. 1993. A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA.

Biochemistry 32: 1899-1904.

- Wang, S.S. and V.A. Zakian. 1990. Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* 345: 456-458.
- Weber, B., L. Allen, R.E. Magenis, and M.R. Hayden. 1991. A low-copy repeat located in subtelomeric regions of 14 different human chromosomal termini. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 179-183.
- Weber, B., C. Collins, C. Robbins, R.E. Magenis, A.D. Delaney, J.W. Gray, and M.R. Hayden. 1990. Characterization and organization of DNA sequences adjacent to the human telomere associated repeat (TTAGGG)_n. *Nucleic Acids Res.* 18: 3353-3361.
- Weisman-Shomer, P. and M. Fry. 1993. QUAD, a protein from hepatocyte chromatin that binds selectively to guanine-rich quadruplex DNA. *J. Biol. Chem.* 268: 3306-3312.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72: 51-60.
- Wilkie, A.O., D.R. Higgs, K.A. Rack, V.J. Buckle, N.K. Spurr, G.N. Fischel, I. Ceccherini, W.R. Brown, and P.C. Harris. 1991. Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell* 64: 595-606.
- Williamson, J.R., M.K. Raghuraman, and T.R. Cech. 1989. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* 59: 871-880.
- Woods, J.P. and W.E. Goldman. 1992. In vivo generation of linear plasmids with addition of telomeric sequences by *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Microbiol.* 6: 3603-3610.
- Wright, J.H., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* 6: 197-210.
- Zakian, V.A. and H.M. Blanton. 1988. Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2257-2260.
- Zhong, Z., L. Shiue, S. Kaplan, and T. de Lange. 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4834-4843.
- Zomerdijk, J.C., R. Kieft, and P. Borst. 1993. Insertion of the promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in an RNA polymerase II transcription unit of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57: 295-304.
- Zomerdijk, J.C., R. Kieft, M. Duyndam, P.G. Shiels, and P. Borst. 1991. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: A telomeric expression site for variant-specific surface glycoprotein genes with novel features. *Nucleic Acids Res.* 19: 1359-1368.

第三章 端粒酶生物化学和调控

Carol W. Greider

Cold Spring Harbor Laboratory

Cold Spring Harbor, New York 11724

端粒复制

真核细胞的端粒具有特殊的复制难题。真核细胞染色体的 DNA 前导链和后随链的复制,始于内部起始点,用来复制基因组的大部分区域,但是染色体分子末端并不完全采取这种复制机制(Watson 1972; Olovnikov 1973)。在了解端粒的分子结构以前,人们已经提出了末端复制的几种模型(Blackburn & Szostak 1984; Zakian 1989)。其中许多模型是基于病毒的末端复制模式。线状噬菌体和病毒基因组与线状真核生物染色体一样,在复制 DNA 末端时也遇到了相同的问题(Gall 本书)。然而,随着纤毛虫端粒的首次克隆(Blackburn & Gall 1978; Klobutcher et al. 1981),发现许多病毒模型并不适合于染色体末端的 DNA 结构。于是复制机制的可能种类缩小到只有几种。

纤毛虫端粒 DNA 是富含 GT 的简单串联重复序列,如在四膜虫中为 d(TTGGGG),在尖毛虫和棘尾虫为 d(TTTTGGGG)。随后在许多其他生物的染色体末端也找到了串联的短重复序列(Henderson 本书)。当然,这些序列在染色体末端的重复次数不同。任何一种已知的四膜虫端粒可能有 50~70 个重复序列,数目并不固定。在下毛亚目纤毛虫如尖毛虫和游仆虫中,其成熟染色体末端只有 3~4 个重复序列。重复的数目不同使得在 DNA 印迹实验中端粒的限制片段呈现模糊不清的外观,这是由于一种特异性的探针和一系列长度稍有不同的分子杂交的缘故。端粒不固定的重复序列数目以及其他两个重要的发现,形成了现在人们广泛接受的端粒长度维持的平衡模型。这两个重要的发现是:① 锥虫在宿主体内连续传代时端粒长度增加(Bernards et al. 1983),在类似的四膜虫实验中,维持在对数生长期的细胞内端粒长度也增加(Larson et al. 1987);② 把四膜虫端粒转入亲缘关系较远的酿酒酵母中也可以起到端粒的作用,并且酵母特有的端粒重复序列可以添加在其线性质粒的末端(Shampay et al. 1984)。

端粒复制的平衡模型表明,由于 DNA 聚合酶不能完整地复制后随链,在通常的 DNA 复制中染色体末端会发生序列丢失(见图 3-1),但是此序列丢失可通过添加序列到染色体末端而达到平衡。由于复制问题未被解决,因此“端粒复制”模型逐渐演变为“端粒长度维持”模型,认为可以通过新序列的添加来解决。所有数据表明末端端粒序列添加是维持端粒长度的机制,于是人们提出了两种模型解释序列添加是如何发生的。第一种模型认为 DNA 重组或聚合酶在重复序列上的滑动可以延伸端粒序列(Walmsley et al. 1984)。参与基因转换的重组可以允许新序列的合成,并且可能通过这种重组机制来获得端粒

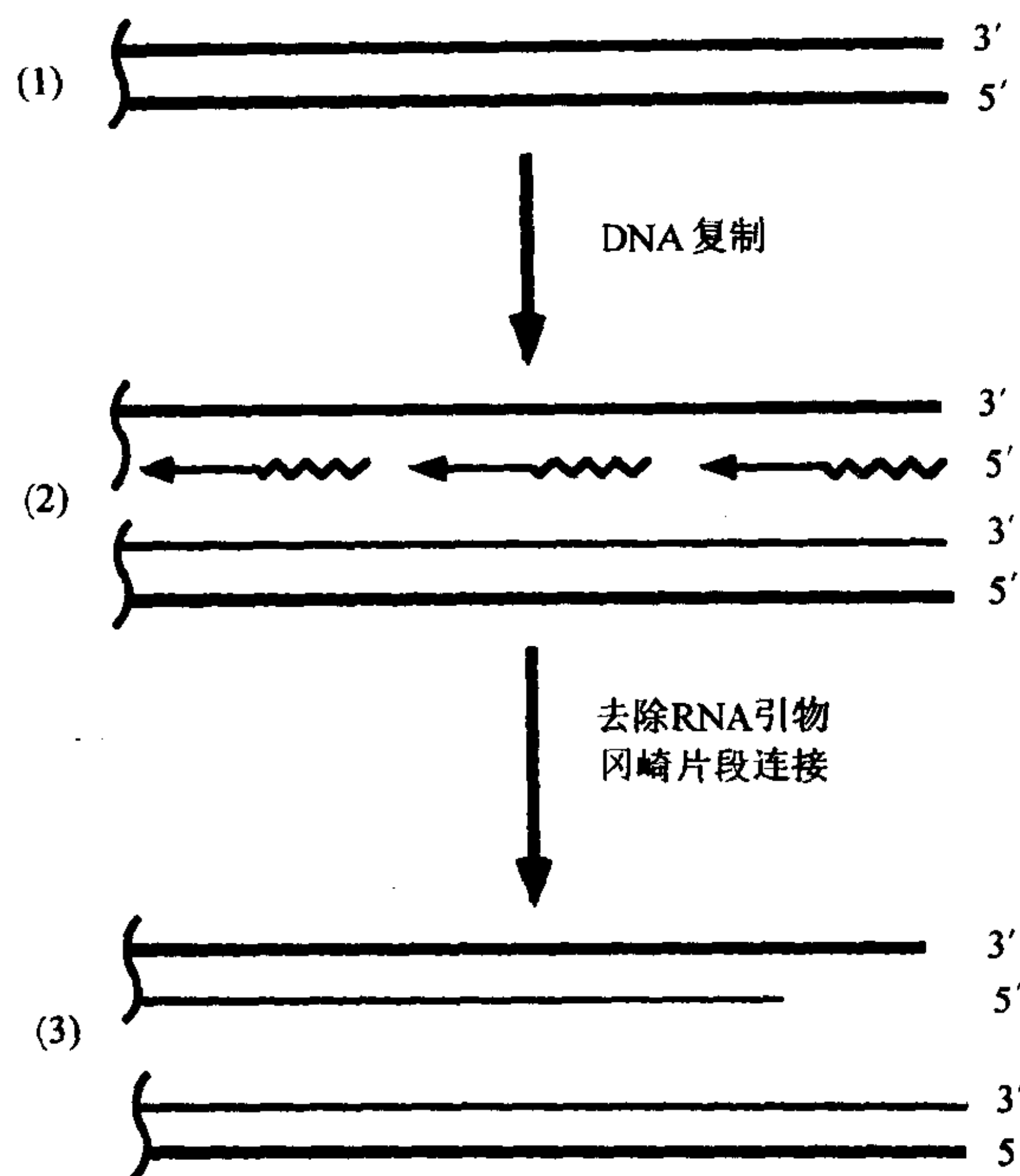


图 3-1 末端复制问题

(1) 线性 DNA 分子末端。(2) 前导链复制达到 DNA 分子的末端,而后随链的复制则利用 RNA 引物和冈崎片段合成。(3)去除 RNA 引物,冈崎片段连接后在一个子代分子末端留下一段未复制区域,假如没有填补此空缺的机制,染色体将随每次循环复制而缩短。

(Dunn et al. 1985)。第二类模型认为,端粒序列是由目前尚未知的聚合酶添加上的,此酶可以在没有模板条件下将序列添加到染色体末端(见图 3-2) (Shampay et al. 1984)。这种

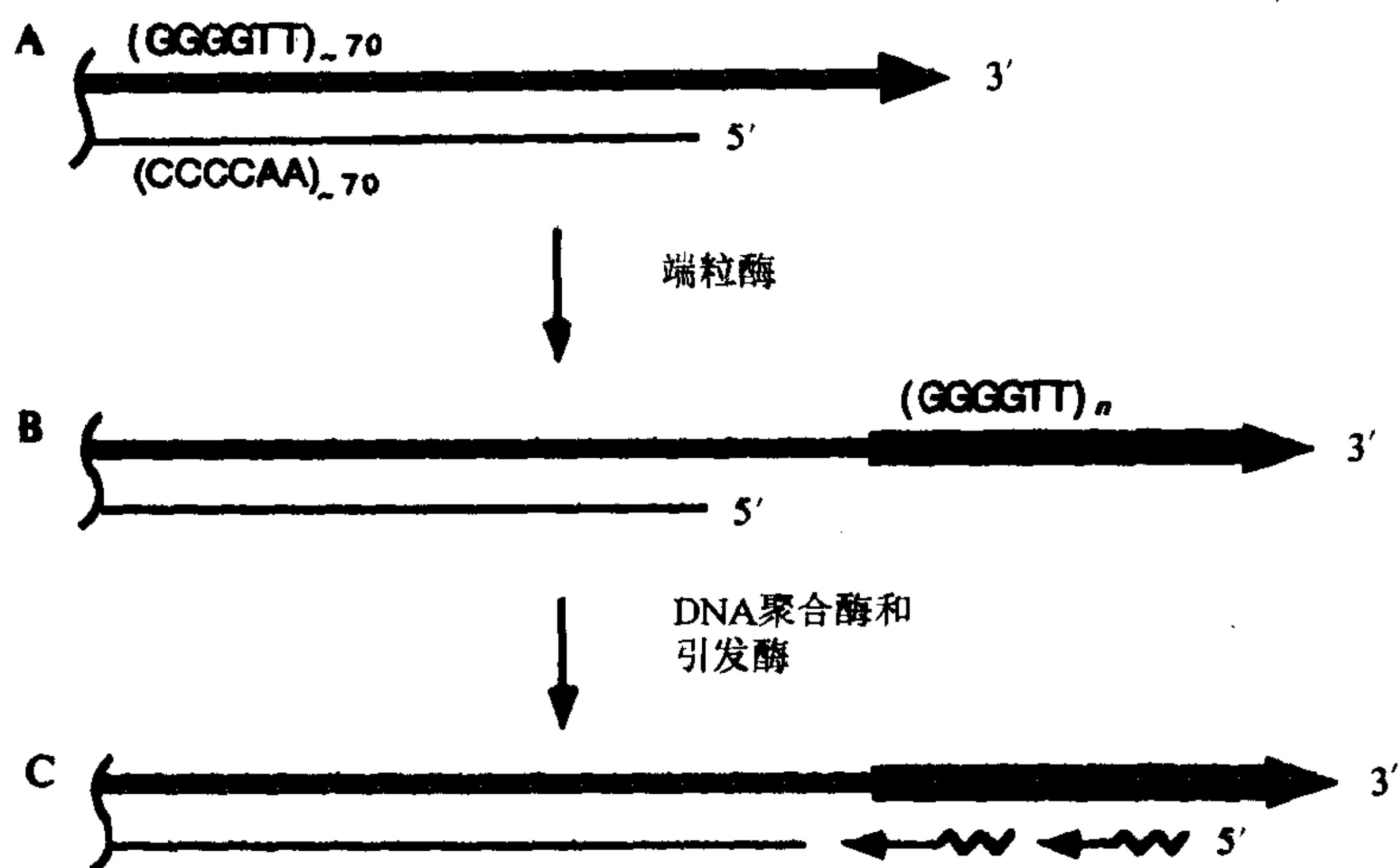


图 3-2 端粒从头延长的机制

A. 四膜虫端粒的结构,G 链上带有一个 12~16 碱基的悬突(Henderson & Blackburn 1989);B. 在 TTGGGG 链上端粒酶引导的 5'→3' 从头延伸导致端粒延长(Greider & Blackburn 1985);C. CCCCAA 链可由常规后随链的复制机制完成。

新的添加方式可以解释在没有两种端粒重复序列混合的情况下,酵母特异的重复序列在四膜虫端粒序列上的添加。在四膜虫中鉴定出端粒特异的 DNA 聚合酶(Greider & Blackburn 1985),并且后来在其他生物中也找到了此酶(Zahler & Prescott 1988; Morin 1989; Shippen-Lentz & Blackburn 1989),支持了端粒维持的端粒添加模型。

四膜虫端粒酶的鉴定

可以通过生物化学实验来检测是否新添加的序列涉及到端粒长度的维持,以鉴定端粒酶活性。选择四膜虫作为细胞提取物来源的原因有两个:首先,其单个细胞就有 40 000 个以上的端粒;其次,在接合期间,新的端粒在巨核发育阶段被加到染色体末端(Blackburn 本书)。据此可以推测四膜虫中添加端粒重复序列的机能很活跃。起初许多测定都采用把 $[^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 结合到染色体末端的方法。1985 年 Greider 和 Blackburn 成功地采用单链端粒引物 $\text{d}(\text{TTGGGG})_4$ 寡核苷酸作为底物用于添加 dTTP 和 $[^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 。他们认为这些合成的寡核苷酸可以模拟天然端粒的 G 链,因为 G 链具有 12bp~16bp 的单链悬突(Henderson 本书)。采用合成的寡核苷酸是一个重要的改进,因为这可以在体外反应中使用高摩尔浓度的引物(Greider & Blackburn 1985)。

一个典型的四膜虫端粒酶反应需要细胞提取物、端粒引物、缓冲液(含镁离子)、 dTTP 和 dGTP 。 dGTP 通常用 ^{32}P 标记以观察产物,也可以标记 dTTP ;但是由于 dGTP 的 K_m 常数远低于 dTTP (Lee & Blackburn 1993),所以用 $[^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 可以获得更高的特异活性(Greider & Blackburn 1987)。末端标记的引物也是底物;但由于许多置入的引物并未延伸,而引物的信号特别强,使得产物更难被检测。当延伸反应的产物在测序凝胶上分析时,可见一条以 6 碱基间隔的梯状条带图案。此 6 碱基周期性间隔对应于加上的每一个 $\text{d}(\text{TTGGGG})$ 重复序列。后来,找到了一种更敏感的检测端粒酶活性的方法,即采用一间接的聚合酶链反应(PCR)方法进行检测(Kim et al. 1994)(见下文)。

最初发现四膜虫端粒酶活性的特点表明由端粒重复序列组成的寡核苷酸引物的延伸是特异的。有趣的是,其特异性并不仅仅限于 $\text{d}(\text{TTGGGG})$ 引物。由其他种类的端粒重复序列构成的寡核苷酸也可以被有效地延伸。利用端粒酶的此特性人们做了一个重要的实验,把由酵母端粒重复序列构成的引物加到一个四膜虫端粒酶提取物中,其产物具有 6 碱基重复特征即 $\text{d}(\text{TTGGGG})$ 重复序列,而不是规则的 G_{1-3}T 端粒重复序列(Greider & Blackburn 1985)。这说明初始引物序列并不决定端粒酶合成的序列;还说明了添加的核苷酸不是通过通常的聚合酶拷贝提取物中的 $\text{d}(\text{CCCCAA})_n$ 序列而进行的。另一个特异性的证据是在细胞提取物中 $\text{d}(\text{CCCCAA})_4$ 引物不能延伸。假如引物延伸是由端粒寡核苷酸和提取物中的 DNA 片段之间发生退火所致,可以推断 $\text{d}(\text{TTGGGG})_4$ 和 $\text{d}(\text{CCCCAA})_4$ 都有同等的机会被延伸。

四膜虫端粒酶延伸特性

四膜虫端粒酶所合成的产物长度通常为数百个核苷酸。在测序凝胶上分离时,可见 6 碱基重复图形。此图形是 6 核苷酸重复序列在某一特异位点上暂停和或链终止的结果

(Greider 1991; Lee & Blackburn 1993)。端粒酶通过在端粒引物的 3' 端一次加上一个核苷酸来合成 $d(TTGGGG)_n$ 重复序列。被变更序列的端粒引物也同样可以正确地加上重复序列中的下一个碱基(见图 3-3)。例如在 $d(TTGGGG)_3$ 引物上由 dT 残基开头,而在 $d(GGGGTT)_3$ 上由 dG 残基开头(Greider & Blackburn 1987),再进行端粒酶延伸,其产物在凝胶上分析时,区带模式变成彼此有 4 个核苷酸偏移。从而进一步证明了在每一 $d(TTGGGG)$ 重复序列中的特殊位点上发生了暂停或终止。端粒酶也指导导致链终止的双脱氧核苷酸的掺入。用适当比例的 $[^{32}P]dGTP$ 和 $ddTTP$ 或 $[^{32}P]dTTP$ 和 $ddGTP$ 进行合成,则加到引物寡核苷酸上的序列可被推断出。用这种方法证明,四膜虫的端粒酶表现为暂停或链终止于 $TTGGGG$ 重复的第一个 G 上(Greider 1991)。

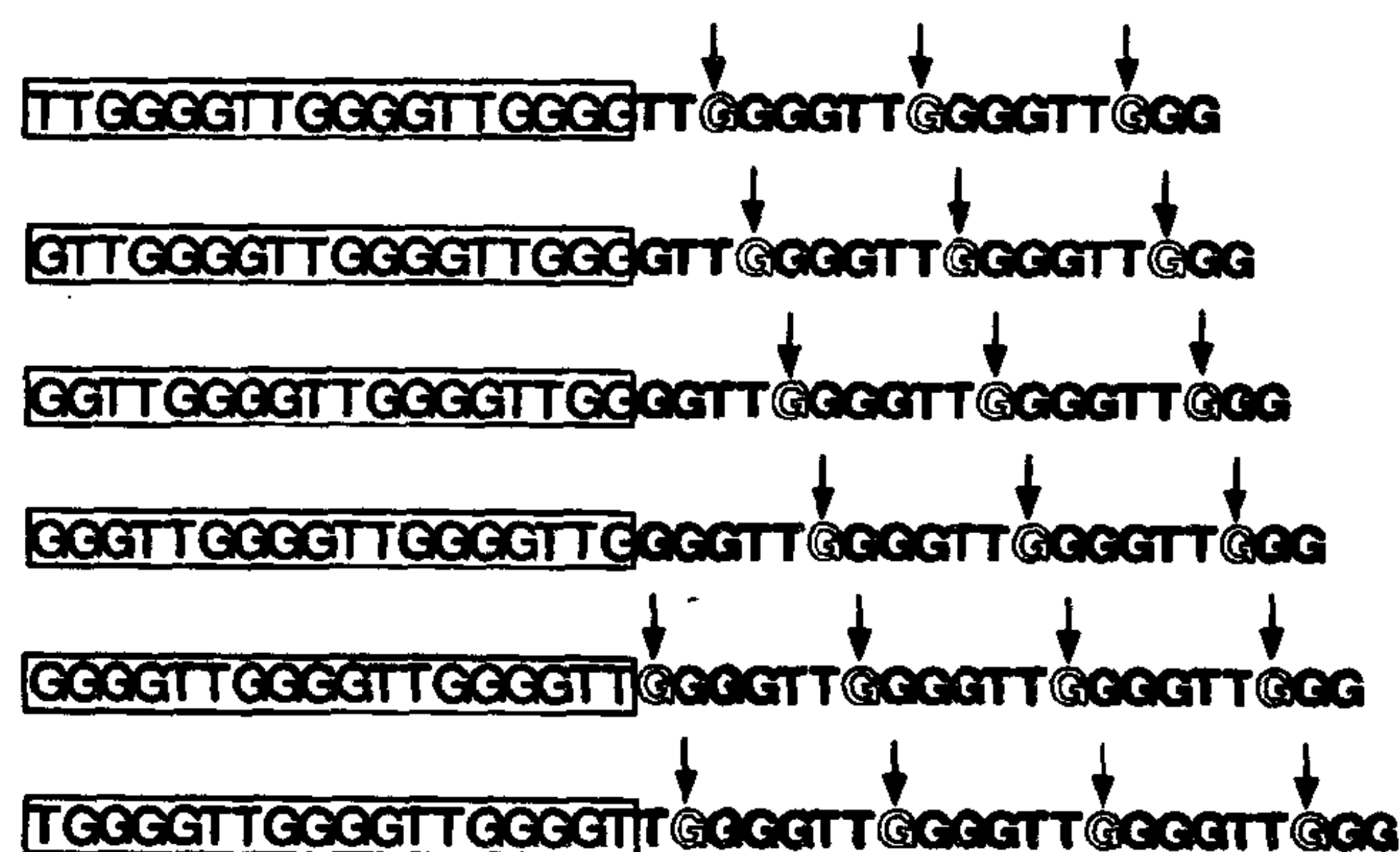


图 3-3 变更序列引物的延伸

依次变更序列的寡聚核苷酸引物(方框内)通过端粒酶延伸,产生正确的端粒重复序列。这里仅举四膜虫端粒酶为例子。端粒酶反应产物的区带模式特征是由于暂停或终止于每一重复序列的特定位点所造成的(图中箭头所指)。在四膜虫中,在序列 $TTGGGG$ 的第一个 G 上,变更序列寡核苷酸的延伸产生相差一个碱基的梯状图式。这种区带模式的改变通常用作鉴别新种属生物端粒酶活性的诊断标准。

长端粒酶产物是在如 $d(GGGGTT)_3$ 或 $d(GGGGTT)_4$ 的引物上被持续地合成的。脉冲追踪实验显示在起初的 2min 内掺入的放射活性,在过量引物寡核苷酸的存在下,与未标记的 $dGTP$ 一起温育 10 或 30min 后可追踪到更长的产物(Greider 1991)。因此,酶在加上每一个 $d(TTGGGG)$ 重复单位后无须从延伸的 DNA 链上脱离(见下文的进一步讨论)。进一步的端粒酶持续合成实验提示端粒序列的延伸是通过一种双位点结合机制(two-site binding mechanism)来完成持续合成的(见下文)。

四膜虫端粒酶 RNA 组分

一种 DNA 聚合酶是怎样确定能够正确地合成 $d(TTGGGG)$ 重复序列而无需任何外源性模板呢? 为回答这个问题,我们检测了端粒酶是否含有核酸组分(Greider & Blackburn 1987)。用 RNA 酶和微球菌核酸酶预处理提取物都使端粒酶活性丧失,这说明端粒酶含有一种必需的 RNA 组分。经 5 步层析纯化端粒酶活性组分,有一小段与酶的活性组分共纯化的 RNA 被鉴定出来。此 RNA 片段被直接测序,并且用合成的 DNA 寡核苷酸

克隆其基因(Greider & Blackburn 1989)。该 RNA 含有 r(CAACCCCAA)序列,可以作为添加 d(TTGGGG)重复序列的模板。为检验与端粒酶活性组分一起纯化得到的 RNA 是否是端粒酶的一部分,在 RNase H(能裂解 DNA/RNA 双链的 RNA)存在下,用与此 RNA 互补的寡核苷酸与端粒酶一起温育。两种寡核苷酸只裂解 RNA 并且端粒酶活性丧失,表明此 RNA 是端粒酶功能所必需的。这两种寡核苷酸还显示 CAACCCAAA 区域参与指导重复序列的合成。缺乏 RNase H 时,一种和模板区互补的寡核苷酸抑制了酶活性,但是另一种 3'端与模板区邻近序列互补的寡核苷酸被有效地延伸(见下文)。在这些实验的基础上,提出了端粒酶合成端粒重复序列的模型(见图 3-4)(Greider & Blackburn 1989)。端粒酶与染色体末端结合,d(TTGGGG)与 RNA 模板区形成碱基对,然后端粒通

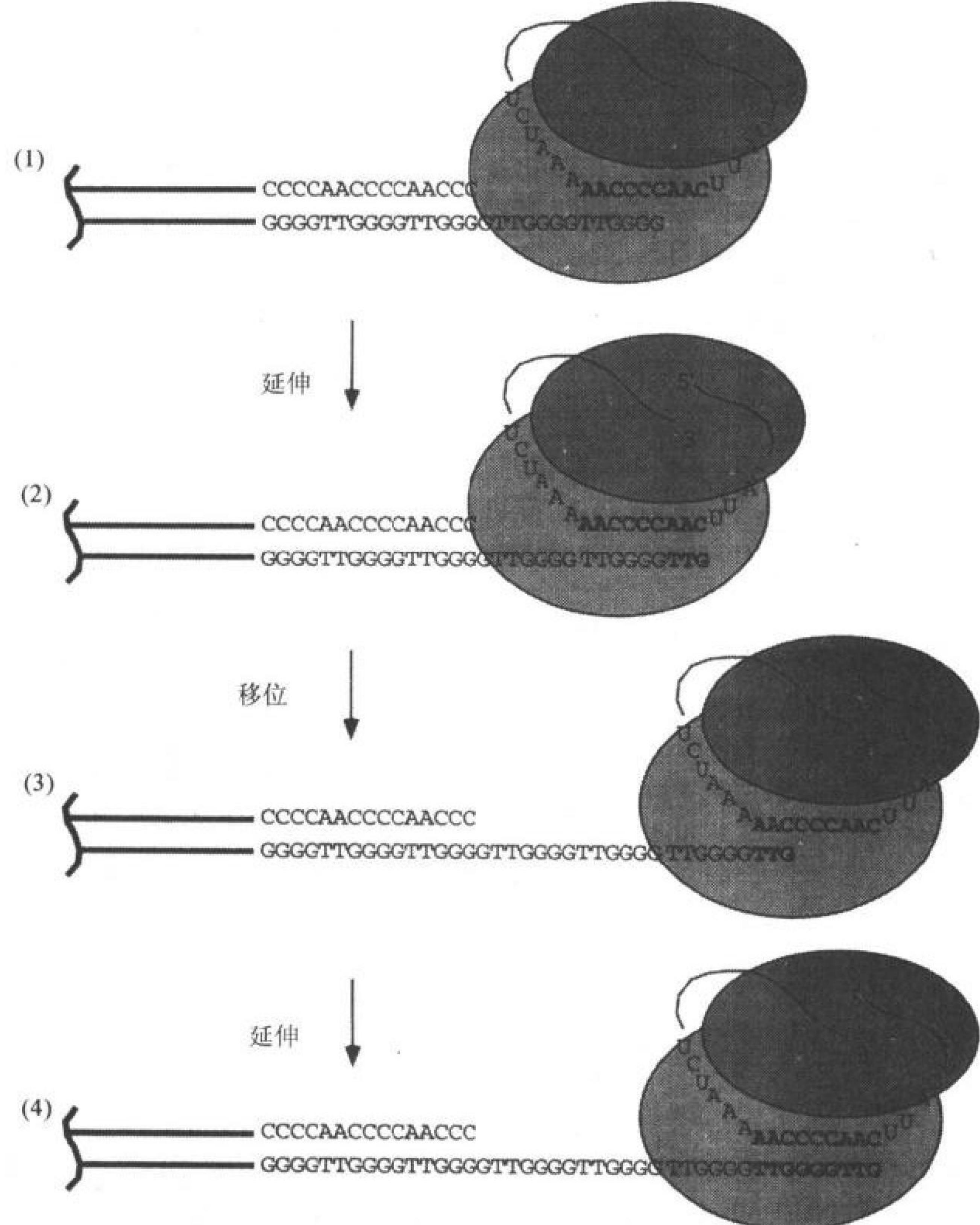


图 3-4 端粒酶延伸模型

(1) 端粒酶识别端粒底物和末端的 TTGGGG 重复序列与 RNA 组分中的 5'CAACCC-CAA3' 模板序列形成碱基配对。(2) RNA 被拷贝到模板区的末端。(3) 移位使末端的 TTGGGGTTG 序列重新和暴露的模板序列对正。(4) 另一轮模板复制产生新的 TTGGGG 重复序列(Greider & Blackburn 1989)。

过在 3' 端添加 TTG 而延伸,随后经一个移位步骤把端粒 DNA 重新置于 RNA 模板的适当位置,使得 TTG 又形成碱基对,进行新一轮延伸。尽管此模型的细节还需要完善,总的来说,该模型经受住了时间的考验。

四膜虫中端粒酶的体内证据

端粒酶 RNA 组分基因的突变分析巧妙地证明了端粒酶在体内负责端粒的合成(Yu et al. 1990)。在端粒酶 RNA 基因的 CAACCCCAA 区域进行了几种单个核苷酸改变,然后重新导入四膜虫细胞中。最先试验的是如下三种突变:48T,CAACCTCAA;49+C,CAACCCCAA 和 44G,CGACCCCAA。结果表明端粒长度发生了改变。其中有两种突变(49+C 和 44G)是在正常的端粒末端加上了不同的序列。这证明端粒酶是负责体内端粒合成的酶,CAACCCCAA 区域起模板作用。

端粒酶 RNA 模板突变体除导致端粒序列的变化之外,还产生许多有趣的表型。在含有突变基因的细胞中端粒长度的调节也发生了改变(Yu et al. 1990)。有时端粒变短,有时则变长。还没有发现核苷酸改变的位点和端粒长度的表型之间有明显的相关性。在大多数端粒序列改变的细胞中,可见核变大,细胞异常病变,且在培养一周后死亡。而未死的细胞都丧失了含有变异基因的质粒。这些与细胞存活力有关的效应可能与细胞中端粒序列变化直接相关。重要的端粒结合蛋白可能不再识别与正常端粒功能有关的末端(Fang & Cech 本书)。

除了在染色体末端添加序列之外,端粒酶在体内还能通过在断裂的片段末端加上端粒序列而“治愈”染色体(Blackburn 本书;Cooke 本书)。在纤毛虫的巨核发育期间,端粒酶能够把端粒重复序列添加到没有明显共有序列的富含 AT 的片段上。当含有突变的端粒酶的四膜虫细胞经历巨核发育阶段时,添加到一个新位点上的第一个重复序列可能是变异的。因此,在体内端粒酶也一定能在富含 AT 序列的末端添加重复序列(Yu & Blackburn 1991)。但是在体外,端粒酶并不能有效地延伸富含 AT 的寡核苷酸(Spangler & Blackburn 1988)。在巨核发育期间,不是对富含 AT 引物的亲和力发生改变,就是存在着在目前的分析方法中未和端粒酶一起纯化的其他蛋白质。染色体的加工和端粒的添加可能是紧密偶联的(Yao 1989;Fang & Cech 本书)。

体内的持续合成能力

已知端粒酶能在体外持续地合成许多串联的端粒重复序列。令人惊异的是,在体内合成端粒模式则为非连续的延伸。当四膜虫端粒酶 RNA 模板突变体在一株野生型细胞中表达时,可能产生两类端粒酶:一种合成野生型重复序列;另一种合成突变型重复序列。当从这些细胞中克隆出端粒序列时,却发现端粒重复序列为二者的混杂产物(Yu & Blackburn 1991;Yu et al. 1990)。此模式不仅见于生长旺盛的细胞(可发生序列快速转换),也见于刚接合的细胞(可在末端加上一大段端粒序列)(Blackburn 本书)。例如,一个克隆末端有序列:(Wt)₃₀(mut)₂(Wt)₁(mut)₈(Wt)₁(mut)₁(Wt)_n(其中 mut 为突变型重复序列,Wt 为野生型端粒重复序列)(Yu et al. 1990)。这类各种序列散布的状态显示了重复序列

合成的一种分布模式。体外短引物的非连续延伸为这种模式提供了一种解释(Collins & Greider 1993; Lee & Blackburn 1993)(见下文)。如果端粒酶的连续合成能力在体内不是必需的,那么为什么端粒酶具有这样一种高效的易位机制进行连续的延伸,而不是简单地在添加每一个重复序列后脱离?可能有许多因素参与这种连续性上的差异。连续的合成可能是在体内合成 4~6 个串联重复序列所必需的,或者这种持续合成的高效性对于某些发育阶段的端粒功能非常重要。在体内,端粒与特异的端粒结合蛋白相互作用,并且端粒延伸可能与其他端粒加工过程竞争。所有的这些过程都影响染色体末端的突变型和野生型端粒重复序列的最终组合方式。

其他生物中的端粒酶活性

除四膜虫外,纤毛虫中的尖毛虫和游仆虫,还有人的永生化细胞系和小鼠、大鼠以及蟾蜍的不同组织中端粒酶活性也得到了鉴定(Zahler & Prescott 1988; Morin 1989; Shippen-Lentz & Blackburn 1989; Prowse et al. 1993; Lingner et al. 1994; Mantell & Greider 1994, 未发表)。在几种不同的酵母种类中还克隆出了 RNA 组分(Singer & Gottschling 1994; McEachern & Blackburn 1995)(见下文)。所有这些鉴定的端粒酶都具有和四膜虫端粒酶相似的特性,即都对 RNase 敏感,并且在延伸具有端粒序列的引物时,一次加上一个核苷酸。当然所合成的序列只对应于每一种生物的端粒重复序列。尖毛虫和游仆虫端粒酶在采用 d(GGGGGT TTTT)_n 作为引物时与 d(TTTTGGGG)_n 引物相比产生 4 个碱基偏移的条带(Zahler & Prescott 1988; Shippen-Lentz & Blackburn 1989; Lingner et al. 1994)。人类端粒酶在延伸 d(TTAGGG)重复序列的所有变更序列的引物时也产生偏移的带形图案。这些实验使得人们鉴定出人端粒酶的暂停位点在 TTAGGG 序列的第一个 G 上。

各种来源的端粒酶产物都相似:都是串联重复的端粒序列。但由小鼠和蟾蜍细胞中分离出的端粒酶,合成的产物远比纤毛虫和人的短(Mantell & Greider 1994; Prowse et al. 1993)。在人端粒酶合成许多重复序列的条件下,小鼠的端粒酶仅产生一个主要的条带(见下文)。再者,其强停止位点随初始寡核苷酸的序列变化而变化。正如人的端粒酶(Prowse et al. 1993),用双脱氧核苷酸替换脱氧核苷酸时,在 TTAGGG 序列中加入第一个 G 残基后发生强停止。

各种生物的端粒酶具有相似的生物化学特性,表明它们之间有相似的酶机制。为了克隆出游仆虫端粒酶的一种潜在的 RNA 组分,人们鉴定出与端粒重复序列互补的 RNA (Shippen-Lentz & Blackburn 1990)。通过在添加 d(TTTTGGGG)₄ 寡核苷酸之后以 RNase H 裂解核 RNA,鉴定出了一个长 192 个核苷酸的端粒酶 RNA。此 RNA 含 CAAAACCCCAAAA 序列,在体外采用反义寡核苷酸抑制实验和与四膜虫端粒酶相似的延伸实验均证明该序列起模板作用。

RNA 序列和二级结构

在首次鉴定出嗜热四膜虫和游仆虫的端粒酶 RNA 组分之后,发现端粒酶利用内部

的 RNA 模板进行端粒重复序列的合成机制可能是保守的。因此,克隆 RNA 集中在两个方面:第一,亲缘关系很近的种属之间端粒酶 RNA 的保守区域的比较;第二,新种属的端粒酶 RNA 的克隆。四膜虫和游仆虫 RNA 序列的显著特征是二者在全部序列上并无广泛的相似性。尽管它们都含有适宜的模板区域,但是二者彼此不杂交(Shippen-Lentz & Blackburn 1990)。

为发现二级结构水平上可能存在的保守区域,Romero 和 Blackburn(1991)克隆了 6 种亲缘关系很近的四膜虫和一种远缘的瞬目虫(*Glaucoma chatti*)端粒酶 RNA。在这组亲缘关系较近的生物中,用 DNA 印迹法鉴定出了与嗜热四膜虫基因杂交的单一一条带。而亲缘关系较远的纤毛虫如草履虫(*Paramecium*)中编码端粒酶 RNA 的基因并不发生杂交。在从 rDNA 序列分析得到的系统发育模型基础上,可见嗜热四膜虫和 *Tetrahymena hyperangularis* 之间有 98% 的同源性(Sogin et al. 1986),而端粒酶 RNA 仅有 72% 的相似性(Romero & Blackburn 1991),这表明,即使是在亲缘关系很近的物种之间,端粒酶 RNA 序列并非高度保守。

对这些 RNA 序列的比较分析,加上用计算机进行的二级结构预测,推导出了一种二级结构模型,此模型包含了进化过程中保守补偿碱基(conserved compensatory base)的变化。这些变化确定了特异的碱基对茎(见图 3-5)(Romero & Blackburn 1991)。预测该

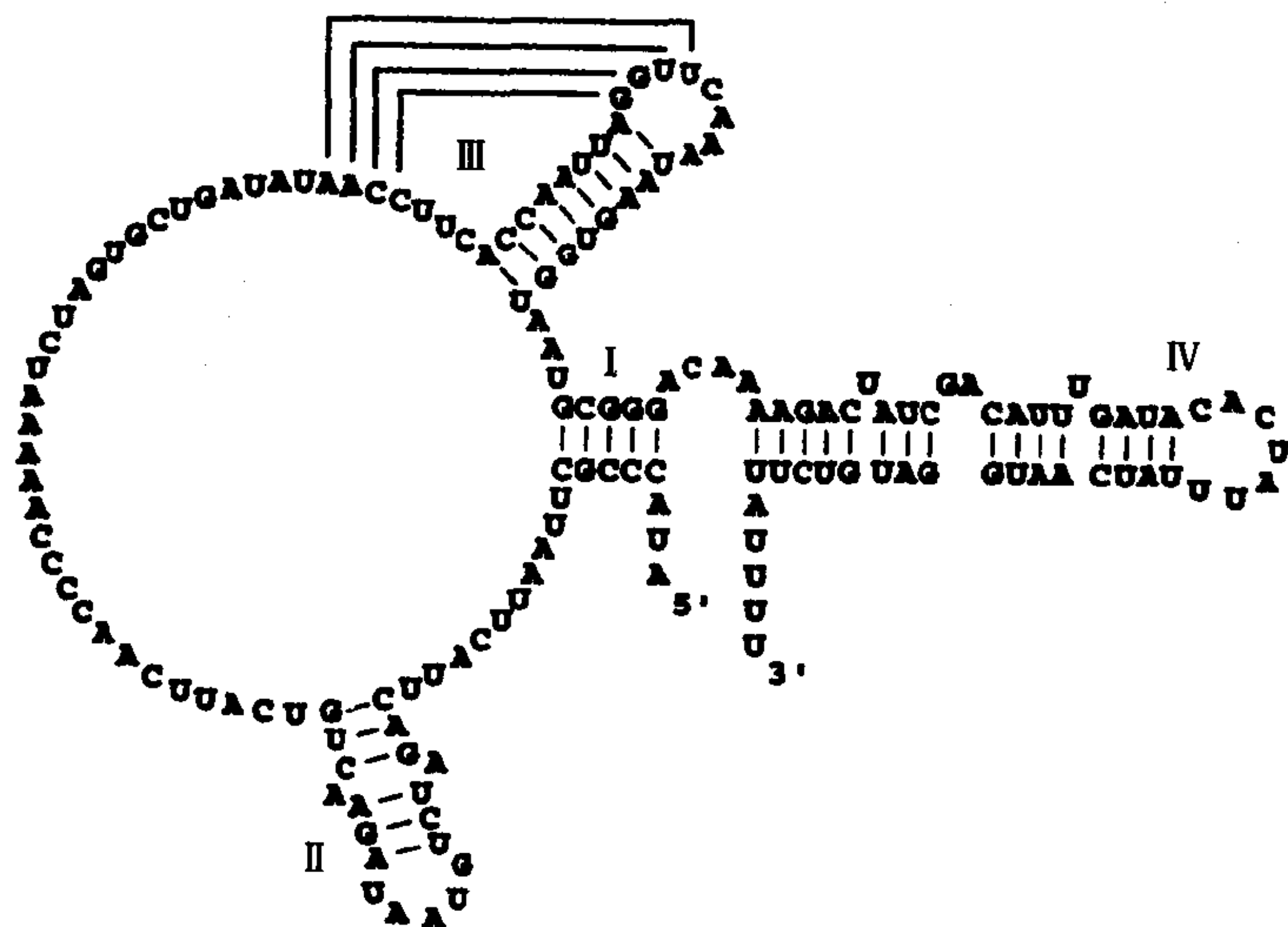


图 3-5 端粒酶 RNA 的二级结构模型

基于不同种类四膜虫的保守 RNA 序列提出的端粒酶 RNA 二级结构模型(Romero & Blackburn 1991,ten Dam et al. 1991)。此图显示嗜热四膜虫 RNA 的序列。其他纤毛虫 RNA 也折叠成类似的二级结构,尽管它们的基本序列有很大不同(Lingner et al. 1994)。尚不知是否除纤毛虫外的其他生物端粒酶 RNA 也采取类似的二级结构。

模型由 4 个茎环结构和一个未赋予任何结构的一大段区域组成。这个未配对区域包含用于拷贝的模板。同时还鉴定出了可能的三级结构中的两个区域;茎 VI 的序列和茎 I 邻近周围的序列可形成碱基配对,茎 III 的环部的序列和邻近的单链区域可能形成一个伪结(pseudoknot)(ten Dam et al. 1991)。对所有纤毛虫包括游仆虫端粒酶 RNA 基因的序列

分析揭示了其上游有保守序列,此保守区域可能是端粒酶 RNA 的启动子成分。该保守序列使得克隆许多其他种类纤毛虫的端粒酶 RNA 成为可能(见下文)。四膜虫端粒酶 RNA 二级结构模型中的许多元件已用化学探针和特异性核酸酶检测所分离的 RNA 所证实。在体外,分离出的 RNA 亚片段可形成上文所提到的伪结结构(Bhattacharyya & Blackburn 1994)。

其他物种也有和四膜虫端粒酶 RNA 一样的二级结构吗?为证明这一点,Lingner 等人从许多纤毛虫中克隆了端粒酶 RNA。还利用保守的上游启动子元件和在厚游仆虫(*E. crassus*)中鉴定的大的模板区域,用 PCR 方法克隆了特异的端粒酶 RNA 基因片段。剩余 RNA 基因序列也在基因文库中得以克隆(Lingner et al. 1994)。采用 RNA 印迹鉴定含有 CCCCAAAA 序列的 RNA,以及用一个文库中的克隆直接对 RNA 测序的方法,克隆了新种尖毛虫(*Oxytricha novo*)RNA(Melek et al. 1994)。尽管稀毛属的端粒酶 RNA 比四膜虫的长(分别约为 190nt¹⁾和 160nt),但基于核苷酸相关分析所推测的二级结构却和四膜虫很相似(见图 3-5)。惟一的例外是茎Ⅱ,在稀毛属纤毛虫的 RNA 结构中未得到确认,并且在另一种四膜虫类纤毛虫 *T. paravorax* 的 RNA 中缺乏(McCormick-Graham & Romero 1995)。

端粒酶生物化学和作用机制

在鉴定了许多种生物中端粒酶活性和克隆了几种端粒酶 RNA 之后,已经可以对这些酶的作用机制进行比较分析。尽管端粒酶的生物化学特性在不同种之间还有细微的差别,但是广泛存在的相似性形成了端粒酶的基本作用特点。

引物特异性

尽管非端粒引物在高浓度时还能进行低效率的延伸,但端粒酶对端粒引物有一种更高的亲和力(Harrington & Greider 1991)。端粒引物的特异性并不局限于那些已分离出端粒酶的生物的端粒序列,许多早期实验中已证明大多数端粒或富含 G 的寡核苷酸可被四膜虫端粒酶延伸。这些寡核苷酸的一个共同特征是通过 Hoogsteen 碱基配对形成分子内结构(Henderson 本书)。因此,人们提出端粒酶可能识别寡核苷酸形成的特殊结构(Greider & Blackburn 1985)。随后的实验显示由 G-G 联系形成的更有序的结构不能为端粒酶所识别(Zahler et al. 1991)。

如果端粒酶不能识别某一特殊结构,而且序列特异性并非专一,那么什么是引物特异性的基础呢?目前得到的端粒引物惟一特征是富含 G 特性(G-richness)。“富含 G 特性”是一个定义不当的词,用于描述可以被有效延伸的引物都含有许多连在一起的 G 残基的现象。人们针对端粒引物特征中富含 G 的重要性进行了三项研究:① 使用一条与 α -地中海贫血病人的 α -球蛋白基因内位于染色体断裂位点处序列相同的引物,即使它不含保守的 d(TTAGGG)_n 重复序列,但仍可以有效地引发端粒酶的延伸(Wilkie et al. 1990; Morin 1991);② 在端粒酶不能进行有效延伸的非端粒引物的 5' 端加上富含 G 的端粒序列时,可变成良好的端粒酶底物(Harrington & Greider 1991);③ 当 3' 端保持稳定,而 5'

1) nt,核苷酸

端逐渐变成富含 G 序列时,引物的有效性也增加(Lee & Blackburn 1993)。所有这些研究揭示除了 RNA 模板区域外,还存在一个引物寡核苷酸可以结合的第二位点(见下文及图 3-6)。

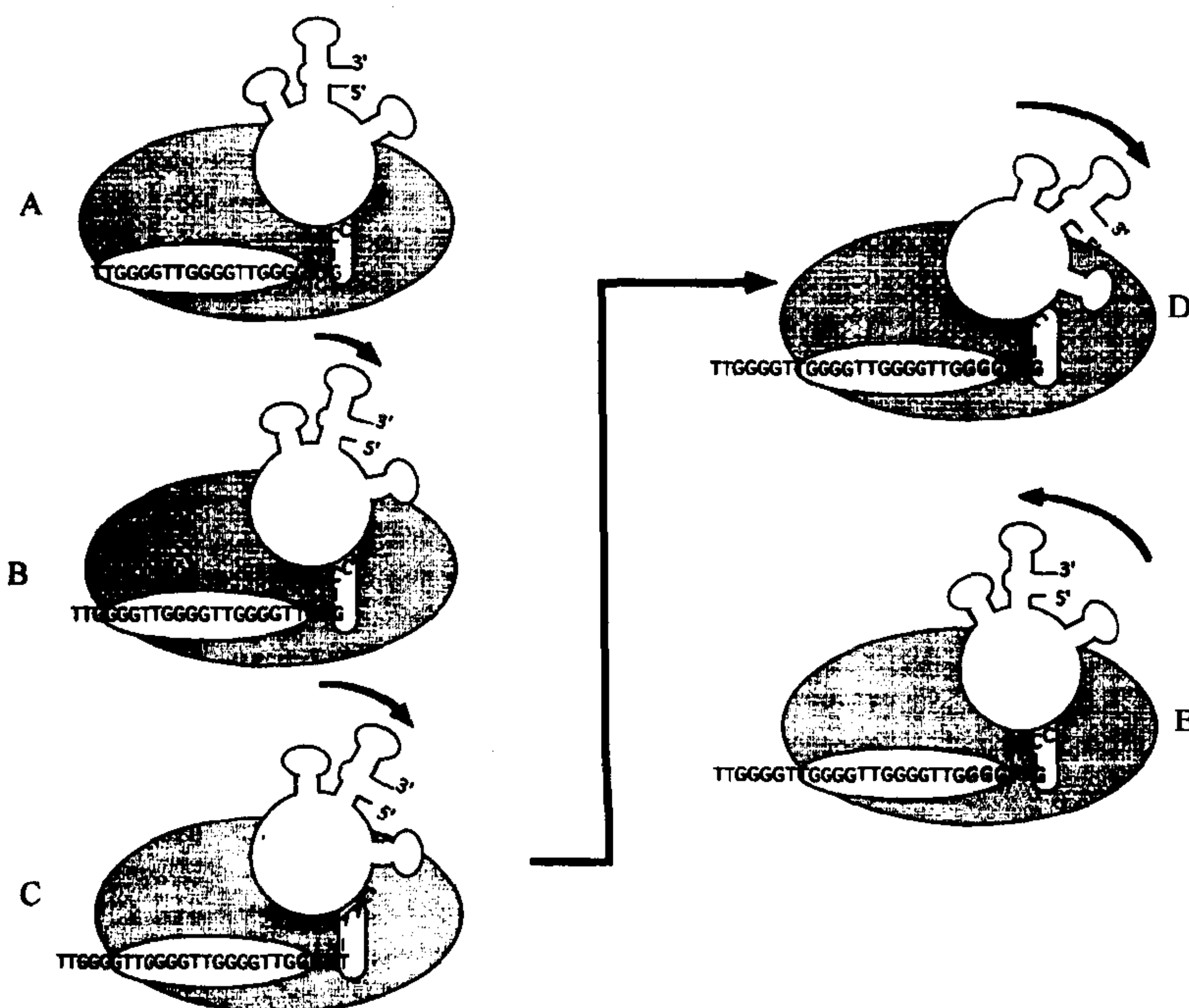


图 3-6 端粒酶延伸的双位点模型

端粒引物寡核苷酸和端粒酶在两个不同位点上相互作用,即 3'末端的序列与模板区域形成碱基对,引物体与第二个位点结合,即“位点 2”。此双位点模型与 RNA 聚合酶的双位点模型相似,双位点是 RNA 聚合酶持续性延伸所必需的(Chamberlin 1992)。为了利用 9nt 的模板区,必须在 RNP 复合物的构象上有所改变。也可能是催化位点沿模板移动,或可能是模板 RNA 相对于催化位点移动。此处为简化起见,显示 RNA 移动,虽然目前还没有 RNA 移动的直接证据。端粒酶 RNA 以二级结构的图形表示,模板在环形区内。起初引物结合之后(步骤 A),3'末端和模板 RNA 并列,并且放置于催化位点以使核苷酸被加上。然后在引物 3'末端一次加上一个核苷酸进行延伸(步骤 B、C 和 D)。为简化起见,加上的核苷酸仅在图中每隔一个显示一次。每一次添加之后,增长的 d(TTGGGG)_n序列被送到“位点 2”使模板和引物之间碱基对氢键的断裂和链的延伸同步。当到达模板的末端时(D),必须进行移位步骤(E)以使重置引物 3'末端和 RNA 模板 3'末端重新配对。此模型阐明移位可以发生而无需 RNA 和新合成的 DNA 之间的 9bp 氢键断裂,并且不需要高能辅助因子进行持续性的延伸。

有几个原因使参与引物识别的参数难于定义。在上述以及其他的研究中明显可知引物结合需要两个位点,每一位点上的序列和长度变化的影响都必须考虑。首先,还不清楚在模板区域和引物结合位点之间是否需要一段距离;其次,应用富含 G 引物时,因形成分子内和分子间的 G-G 碱基配对而使所有的试验复杂化。离子条件对形成这些结构的核苷酸比例影响很大(Williamson et al. 1989; Zahler et al. 1991),并因此影响适合端粒酶的引物比例。不同实验室在不同的缓冲液条件下检测了端粒酶的活性。此外,引物中序列和长度的改变同时改变了端粒酶引物识别特性和形成 G-G 碱基配对结构的能力。抛开这些定量分析的障碍,从几个实验室的工作中我们可以对富含 G 引物和引物 3'末端与 RNA

模板之间的相互作用的重要性有一个定性的认识。

端粒酶的持续合成能力

端粒酶持续合成能力实验支持引物结合的双位点模型。首先,人端粒酶使不同长度引物产生不同长度的产物。引物 d(TTAGGGTTA)的产物长度比(TTAGGG)₂的产物短。因为 d(TTAGGGTTA)通过添加 3 个 G 转变为(TTAGGG)₂。有人认为短引物的识别一定能影响持续合成能力。早期实验表明四膜虫端粒酶采用 d(TTGGGG)₃和 d(TTGGGG)₄作为引物时表现高度的持续性合成能力。后来实验使用更短的寡核苷酸,结果表明引物的长度极大地影响酶的持续合成能力(Collins & Greider 1993; Lee & Blackburn 1993)。引物 d(TTGGGG)₁和 d(TTGGGGTT)₁延伸时仅添加一个与 RNA 模板区相应的重复序列,进一步的延伸不能进行,这表明延伸达到模板的末端后产物脱离。这些实验说明长度大于 10 个核苷酸的引物可以被持续地延伸,因为它们能同时与模板和第二个位点或“锚定位点”(anchor site)结合。与锚定位点的结合能阻止产物在移位时脱落。目前的锚定位点结合模型与以往所认为的不同,以前认为与锚定位点结合的序列保持结合状态,增长的产物呈环出序列(looped out);或者增长的链在持续延伸期间滑过锚定位点(Morin 1989; Harrington & Greider 1991; Collins & Greider 1993; Lee & Blackburn 1993)。后者是基于 RNA 聚合酶的持续性延伸机制之上。RNA 聚合酶结合在正在延伸的 RNA 链的聚合位点(位点 1)与离 3' 末端至少 8 个核苷酸远的第二个位点(位点 2)上,此双位点机制使得在移位过程中 3' 末端释放,同时与增长的链保持连接以进行第二轮序列添加(Chamberlin 1992)。

早期用小鼠和蟾蜍端粒酶进行的实验显示其合成产物大多数为 1~2 个重复序列长度,而最近的实验显示蟾蜍、小鼠和大鼠端粒酶在一定条件下也能持续地延伸。把 dGTP 浓度升高到人端粒酶所用浓度的 100 倍以上时,蟾蜍的端粒酶也能合成与人端粒酶类似的长产物(L. L. Mantell & C. W. Greider 未发表)。随后用小鼠和大鼠的端粒酶,证明也能在高 dGTP 浓度下合成长产物(K. Buchkovich & C. W. Greider 未发表)。因此,不同生物端粒酶持续合成能力的差异可能是部分地由于酶和 dGTP 的亲合力不同所致。

RNA 模板定义

当克隆出四膜虫端粒酶 RNA 并鉴定出同端粒重复序列互补的 9 个核苷酸区域后,便可发现这样的问题:9 个“模板”核苷酸怎样特异地决定 6 核苷酸的重复序列呢?图 3-4 的模型显示并非所有的 r(CAACCCCAA)的 9 个核苷酸都提供 d(TTGGGG)重复添加的信息。随后克隆的游仆虫端粒酶 RNA 中有 20 个核苷酸的模板特异地决定 8 碱基端粒重复序列,更说明了这个问题,即有多少并且是哪几个核苷酸用于添加端粒重复序列。为此采取了三种方法来解决这个问题:分析引物延伸过程中的暂停模式、与 RNA 互补的 DNA 寡核苷酸的延伸和端粒酶 RNA 的突变分析。

暂停模式

四膜虫重复模式的强停止发生在 TTGGGG 序列中加上第一个 G 残基之后(Greider

1991),这个位置与 RNA 模板域的末端相关。可能是在拷贝到模板的末端之后,移位是一个较慢的阶段,可导致此处暂停或酶解离。假如其他端粒酶的机制与四膜虫相同,则绘制暂停位点应该有助于定义模板核苷酸。比较小腔游仆虫(*E. aediculatus*)和新种尖毛虫的区带图式显示两种图式相差 1 个核苷酸(Lingner et al. 1994)。尖毛虫暂停于第 4 个 T 残基,而游仆虫暂停于第一个 G 残基(TTTTGGGG)。两个 RNA 组分的模板序列都为 CAAAACCCCAAAA。不同的区带模式表示模板区域可能相差一个核苷酸。在尖毛虫中最后的 C 不作为模板,而对于游仆虫最后的 C 则作模板用。序列 CAAAACCCCAAAA3' 末端 4 个核苷酸作为校准区域,而游仆虫的 CAAAACCCCAAAA 序列中 5 个核苷酸用于校准。比较数种端粒酶的可能模板区域的区带图式,表明并非所有的可能模板区域都作为模板核苷酸进行拷贝。四膜虫端粒酶为第一个被研究的酶,此酶确实拷贝到了可能模板序列的末端,显然这是一个偶然的发现。但无论如何,通过四膜虫端粒酶的研究,使得人们直接弄清了端粒酶的延伸/移位机制。

RNA 互补寡核苷酸

首次克隆了一个四膜虫端粒酶 RNA 后,人们设计了一个实验用来检测所克隆的 RNA 是否为一个必需的亚单位。一系列的反义寡核苷酸同端粒酶一起孵育,并且加入 RNase H 以检测序列特异性的酶抑制作用。RNase H 裂解 DNA:RNA 双链中的 RNA。此 RNase H 实验曾经成功地用于确定参与剪接的 RNA (Black et al. 1985; Krainer & Maniatis 1985)。被设计成与模板域邻近序列杂交的寡核苷酸(见图 3-7)有两个不寻常的特性:第一,即使 RNA 没有被裂解,与模板区域互补的寡核苷酸仍可抑制端粒酶活性,这可以解释为杂交的寡核苷酸空间占位阻断了聚合作用;第二,与模板的近 5' 末端杂交的寡核苷酸可以用 TTGGGG 重复序列延伸,这表明此寡核苷酸的 3' 末端靠近端粒酶活性位点,所以可以和正常的 TTGGGG 引物竞争(Greider & Blackburn 1989)。这些结果为进一步研究其他生物端粒酶 RNA 的功能打下了基础。

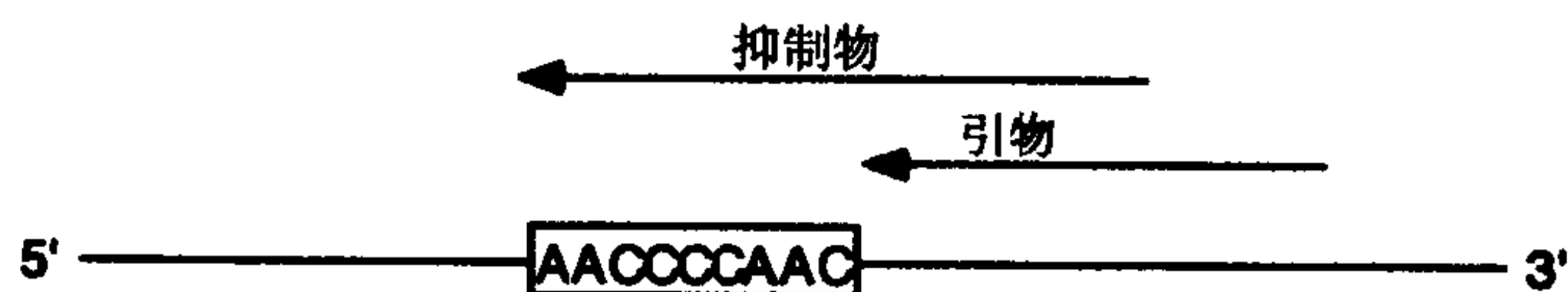


图 3-7 RNA 互补的寡核苷酸

反义 DNA 寡核苷酸一直被用于研究不同种类的端粒酶活性。在大多数的此类研究中,与端粒酶 RNA 互补且与模板杂交的 DNA 寡核苷酸抑制端粒酶活性。相反,3' 末端紧邻模板序列的寡核苷酸可作为端粒酶延伸的引物。这里用四膜虫端粒酶 RNA 模板序列为例。

可以和模板 5' 末端杂交并延伸直至覆盖游仆虫和尖毛虫端粒酶 RNA 模板区域的寡核苷酸能抑制端粒酶活性。然而,与模板 5' 端杂交的寡核苷酸并不总像在四膜虫端粒酶中那样延伸。三项研究鉴定了一系列的寡核苷酸,其 3' 末端终止于下毛亚目的端粒酶模板区的不同位点上(Shippen-Lentz & Blackburn 1990; Lingner et al. 1994; Melek et al. 1994)。由于所有的抑制物寡核苷酸都在 3' 末端有端粒序列,使进行反义寡核苷酸的抑制分析变得复杂,因此,除与端粒酶 RNA 杂交外,它们还能模拟端粒序列引物。这两种相互

作用模式哪一个占优势则取决于许多因素,包括盐类、温度、寡核苷酸浓度以及和 RNA 互补的程度。我们事先不可能知道采用哪种相互作用模式。应用这种反义寡核苷酸绘制尖毛虫端粒酶 RNA 的功能性模板区,两组研究得出两个不同的结论。第一组认为模板区包含了 CAAAACCCCAAAA 序列的 3' 末端(Melek et al. 1994)。第二组研究认为模板在 5' 端区域CAAAAACCCCAAAA。第二种结论与上述分析尖毛虫端粒酶暂停模式相一致。因为反义寡核苷酸与端粒酶相互作用的方式与引物寡核苷酸不同,所以用这些寡核苷酸的实验很难得出结论。对模板区的进一步解析还有待于对尖毛虫和游仆虫 RNA 的突变分析。

体内突变的端粒酶 RNA 模板

四膜虫端粒酶 RNA 的模板区突变实验在体内和体外都曾经进行过。早期的实验确定了重要的两点事实:① 端粒酶在体内合成端粒;② CAACCCCAA 区域提供模板(Yu et al. 1990)。后来的实验着重于确定此序列中哪一些核苷酸提供模板信息。早期的体内研究中,用克隆染色体末端测序的方法来鉴定端粒酶作用下合成的序列。人们试验过 3 种突变体:第 44 位点的 A→G 突变(44G)、48 位点的 C→T 突变(48T)和添加一个多余的 C 残基(49+C)。44G 和 49+C 突变体分别产生 GGGGTC 端粒重复序列和 GGGGGTT 突变的端粒(原文可能有误,译者注),这表明这两个位点都是 RNA 的模板核苷酸。48T 突变不能导致体内端粒序列改变,然而,端粒长度急剧缩短(见下文),这表明 TTGAGG 端粒在体内不能被耐受或者此突变产生一个显性失活的端粒酶 RNA。由于此显著的生长变化同端粒酶 RNA 模板的突变协同发生(见下文),因此很难解释染色体序列不发生变化这一现象。最近有人采用直接从表达突变 RNA 的细胞中分离变异的端粒酶的新方法(Gilley et al. 1995)来解决此难题。

体外突变的端粒酶 RNA:重构四膜虫端粒酶

为了分析端粒酶在体外的作用机制,用蛋白质和合成的 RNA 组分在体外重新合成了四膜虫端粒酶功能(Autexier & Greider 1994)。用微球菌核酸酶去除部分纯化端粒酶中的 RNA 组分,失活核酸酶并加入合成的野生型端粒酶 RNA,天然端粒酶的引物特异性和持续合成能力都得到恢复。利用模板 CAACCCCAA 的突变体重构端粒酶,检测了提供模板信息的区域。模板的 5' 区域突变体UAACCCCAA 和 CGGCCCCAA 特异性地改变了产物序列。这些结果与图 3-4 中的端粒酶延伸模型一致。模板的 5' 端区域决定了所掺入的核苷酸,而 3' 末端区域的核苷酸起校准引物核苷酸的作用。

因为序列 CAACCCCAA 中有冗余序列,改变仅一半的冗余序列就会导致不完全合成和短产物。这可能是在校准区引入错配所致。例如,当突变体UAACCCCAA 指定引物 d(GTTGGG)₃ 延伸时,最初合成的序列是...GTTA。当此引物下一步与 RNA 对准时,在位置 43 处有一个 C-A 错配。尽管总体反应效率急剧降低,这些错配仍被耐受了。当校准区有一突变如 CAACCCUAA, (TTGGGG) 的延伸也同样不完全。然而,用一条 3' 末端与突变的 RNA 互补的嵌合引物(TTGGGG)₂TTAGGG 延伸时,可恢复有效的延伸(Autexier & Greider 1994)。

尽管对这些突变的 RNA 分析表明了哪些位点可以作为模板,但很明显模板区是可

变的。体内 TTGGGGG 突变端粒的合成显示端粒酶能容纳一个多余的模板核苷酸(Yu et al. 1990; Yu & Blackburn 1991)。体内或体外用 49+C 突变体重构端粒酶也可以合成 7 碱基的 TTGGGGG 端粒重复序列(Gilley et al. 1995; C. Autexier & C. W. Greider 待发表)。缩短模板区也显示模板区的可变性。删除模板 5' 末端 C 残基, 产生 AACCCCAA, 仍然能够合成 TTGGGGG 重复序列(C. Autexier & C. W. Greider 待发表)。49 位 C 可能在此时作为模板使用。分析其他的突变有助于确定模板区的边界以及决定什么样的模板丰余度是持续性延伸所必需的。

引物切割

除引物延伸外, 四膜虫端粒酶也能切割某些引物的 3' 末端的核苷酸(Collins & Greider 1993)。从生物化学的角度来看, 这种切割活性与简单的核苷酸结合的相反过程或焦磷酸分解过程不同, 它不被焦磷酸盐所激活。引物切割是用 5 种不同排列顺序的 (TTGGGG)₃ 引物, 采用高度纯化的端粒酶提取物延伸反应后相互比较得出的。正如期望的那样, 大多数引物的第一个标记产物长度为 19 个核苷酸, 然而, 一个引物 (GGGTTG)₃ 的延伸在第 18 位产生一条放射性标记的条带, 提示这条引物末端的 dG 从 3' 末端被去除, 而加上一个 [³²P]dGTP 产生一个与原先引物同样大小的标记产物。其他一些证据显示引物切割活性是端粒酶固有的, 此引物切割的活性可以和端粒酶一起纯化超过 1000 倍, 并在甘油梯度中共沉降。6 种可能的不同排列顺序的引物中只有 1 种被切割, 非特异性的核酸酶是不可能如此的。切割活性本身对 RNase 敏感, 并且, (GGGTTG)₃ 位点 18 上添加 [³²P]dGTP 的动力学与在 (GGGGTT)₃ 的位点 19 上添加的动力学相似。

切割活性还可以从引物 3' 端移走 dGTP 以外的核苷酸, 表明此活性可能是一种编辑形式。非规范的序列 GGGTTA、GGGTTT 或 GGGTTTG 结尾的 18 个核苷酸引物 3' 残基被移去, 并且 [³²P]dGTP 被添加在 18 位上。只有位于模板 (CAACCCCA)-5' 末端最末端的 rC 或其外并和端粒酶 RNA 模板校准的寡核苷酸是切割活性的底物, 这表明切割的活性位点是在模板的 5' 末端。

重构的端粒酶组分也有切割活性。d(GGGTTG) 切割见于突变的 UAACCCCAA 端粒酶 RNA 模板, 并且是 dATP 而非 dGTP 添加在位点 18 上(Autexier & Greider 1994)。当模板缩短为 AACCCCAA, 去掉切割发生的模板位点时, 则不发生 (GGGGTTG) 切割(C. Autexier & C. W. Greider 待发表), 这和那种认为切割位点局限于野生型模板的 5' 末端区域观点一致。

端粒酶功能中的引物切割功能的作用还不清楚, 它可能是提供校正功能或参与端粒酶的持续合成功能。切割活性的特点和 RNA 聚合酶的特点最接近。当有活性的 RNA 聚合酶遇上某一序列时, 聚合酶发生暂停, 正在延伸的 RNA 链的 3' 端发生切割 (Surratt et al. 1991; Izban & Luse 1993), 切割之后进行持续的合成。端粒酶的切割活性也和自然暂停有联系。在模板 5' 末端残基 CAACCCCAA 指导下添加 dGTP 后, 模板的末端发生暂停, 这种相似性可能表明有相似的持续性延伸机制或说明端粒酶和 RNA 聚合酶在进化中有相关性。目前, 切割活性只在四膜虫端粒酶中得到较完整的鉴定。最近发现, 芽殖酵母端粒酶也鉴定出可能的切割活性(见下文), 可能有助于描述切割活性在端粒延伸中的

作用(Cohn & Blackburn 1995; Lin & Zakian 1995)。

端粒酶和端粒结合蛋白的相互作用

已经找到了一种体外检测方法以确认端粒酶通过何种途径接近体内染色体的末端区域。在标准的端粒酶检测中,可获得单链寡核苷酸,由它作为重复序列添加的引物。但是在体内端粒被组蛋白和特异性的端粒结合蛋白结合。目前研究得最清楚的端粒结合蛋白来自下毛亚目纤毛虫的尖毛虫。两个端粒结合蛋白亚基, α 和 β ,和单链富含G的端粒末端紧密结合(Fang & Cech 本书)。此端粒蛋白的可能类似物在四膜虫中也得到鉴定,四膜虫端粒的染色质结构表明在端粒上存在该种类似物的复合物(Budarf & Blackburn 1986; Sheng et al. 1995)。人们推测端粒酶在和端粒结合蛋白结合时必须替换此蛋白质和延伸G链。用尖毛虫的末端蛋白质进行的试验表明聚合酶,包括从大肠杆菌来的Klenow片段和病毒反转录酶,与末端蛋白质结合时都可以采用富含G的端粒序列作为模板(Shippen et al. 1994)。此外,结合的单链GGGGTTTT序列可以和互补的寡核苷酸CCCCAAA杂交(Raghuraman & Cech 1989; Raghuraman et al. 1989)。因此,DNA-蛋白质复合物中的核苷酸可以被识别,尖毛虫末端蛋白质结合的端粒引物也能用于端粒酶延伸,这些都表明端粒酶可以直接在体内与端粒发生作用,延伸染色体末端,并且仍然与末端蛋白质保持结合状态(Shippen et al. 1994)。

酵母端粒酶

酵母菌的遗传学分析有助于人们对体内端粒酶功能的认识。为从遗传学角度鉴定端粒酶组分,人们分析了具有短端粒和长端粒的酵母突变体(Zakian 本书)。有*tel1*和*tel2*、*rap1*和*est1*突变的菌株可导致短端粒(Lustig & Petes 1986; Lundblad & Szostak 1989; Lustig et al. 1990);存在*rap1*的其他等位基因的细胞产生的端粒远比正常端粒长;*cdc17*(DNA聚合酶 α)突变体生长在半允许温度下,端粒进行性地变长(Carson & Hartwell 1985)。在这些早期得到鉴定的突变体中,对于端粒酶组分影响最大的是*est1*基因,缺失此基因(*est1 Δ*)的细胞,其端粒进行性缩短,大多数细胞最终死亡(Lundblad & Szostak 1989)。假如有一套野生型重组系统,有些细胞可以通过重组把端粒相关的Y'元件结合到缩短的染色体末端上以维持端粒长度,进而逃脱死亡(Lundblad & Blackburn 1993; Zakian 本书)。端粒酶在体外的活性最近在酵母(*S. cerevisiae* & *S. castellii*)中得到鉴定,此实验将分析出端粒酶的各组分(Cohn & Blackburn 1995; Lin & Zakian 1995)。

在两种酵母中成功地应用了两种完全不同的方法鉴定端粒酶RNA组分。一种方法对可能存在的酵母端粒酶RNA进行系统地搜索,发现数种芽殖酵母有异常长的端粒重复序列(约26bp)(McEachern & Hicks 1993; McEachern & Blackburn 1994)。这些重复序列的动力学行为表明它们是由端粒酶合成的,因此,推测编码端粒酶RNA的基因应该至少含有一个重复的端粒互补序列。为克隆编码端粒酶RNA的基因,人们将*Kluyveromyces lactis*总基因组DNA用BAL 31消化以去除所有的端粒重复序列。当此DNA用一个端粒重复序列作探针进行DNA印迹分析时,检测到了一条染色体内部分

带。对此内部位点进行克隆,发现含有端粒序列和它的两端各 5 个核苷酸重复区域,这与纤毛虫端粒酶 RNA 的模板序列冗余部分相似。为确认此克隆的染色体区域编码了端粒酶 RNA,引入了 2bp 的突变,在可能的模板区形成一个 *Bgl* II 限制位点,并且野生型位点用突变拷贝替换。在突变细胞生长了数代之后,用杂交的方法检测到了端粒上的突变序列,用 *Bgl* II 消化可移去突变重复序列并缩短端粒带。这样,染色体内部假定的端粒酶 RNA 的变化改变了端粒重复序列,充分证明了此基因编码端粒酶 RNA 组分。RNA 印迹分析显示由此基因座编码的 RNA 长度为 1.3kb,远远长于纤毛虫端粒酶中的 RNA。

用另一克隆端粒酶组分的方法克隆了酿酒酵母端粒酶 RNA 基因。靠近酵母端粒的基因转录被抑制(Gottschling et al. 1990;Shore 本书)。这种转录沉默,即端粒位置效应(telomere position effect, TPE),可能和果蝇中的异染色质中的位置效应(Henikoff 1990)相似。为总体了解端粒沉默和端粒功能,人们进行遗传学扫描用以鉴定哪些基因过度表达时能够缓解 TPE。结果找到了 10 个基因,从这 10 个基因中进一步扫描对端粒代谢有影响的基因。其中有一个基因,*TLC1*,有缩短的端粒。此基因可以和一个 1.3kb 的 RNA 进行 RNA 印迹杂交。然而,在克隆的片段中没有发现可读框(Singer & Gottschling 1994)。仔细分析此 DNA 序列后发现一个 17 个核苷酸区域与酿酒酵母端粒序列互补。虽然这种酵母中的端粒重复序列不规则,但此基因中 17bp 序列正好是在许多酿酒酵母染色体愈合位点分析中预测到的端粒酶 RNA 序列(Kramer & Haber 1993;Cooke 本书)。为核实此基因是酵母端粒酶 RNA 组分,对编码可能的模板区域序列进行突变,产生一个限制位点,在体内表达突变 RNA 的酵母把突变的端粒重复序列添加在新引入的端粒中,证实了预测的 RNA 模板功能(Singer & Gottschling 1994)。

从克隆的纤毛虫端粒酶 RNA 中没有预测到乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*)和酿酒酵母的大分子端粒酶 RNA。尚不清楚这些 RNA 将形成何种结构或者这些端粒酶 RNA 的“额外”序列有什么功能。酵母 U2 RNA 也远远大于其他种类的 U2 RNA。然而这些大 RNA 在删除一大段内部区域后,可以形成与较短的哺乳动物 RNA 相同的二级结构,并且删除过的 RNA 在体内仍有功能(Ares 1986; Igel & Ares 1988)。酵母端粒酶 RNA 删除性分析可能是推测一个结构模型或 RNA 不同区域的功能确定之前所必需的。除了大小有区别外,转录酵母 RNA 的聚合酶看来还和纤毛虫的聚合酶不同。四膜虫和其他纤毛虫端粒酶 RNA 具有 RNA 聚合酶 III 转录物的特点:在一串 8T 残基处终止,对 α -鹅膏蕈碱的拮抗与 5S RNA 相似。酿酒酵母 RNA 有 T 残基片段的内部片段,可以认为是聚合酶 III 转录终止位点。因此,确定何种 RNA 聚合酶负责转录此基因将是很有趣的工作。

乳酸克鲁维酵母和酿酒酵母缺失端粒酶 RNA 基因的表现型与以前 *est1* 缺失菌株的表现型相似。在两种情况下,端粒都随细胞分裂进行性地缩短,并且细胞出现严重的病态。然而,也有“幸存者”在重组时恢复了端粒长度(Lundblad & Blackburn 1993; McEachern & Blackburn 1995)。

脊椎动物的端粒酶调控

在正常的复制过程中,端粒酶把端粒重复序列加到染色体末端以克服序列的丢失。虽然此端粒长度的平衡仅存在于永生化的单细胞真核生物中,但是大多数原发的人类细胞

看来缺乏端粒酶活性(Counter et al. 1992;Kim et al. 1994)。在体内和体外人体细胞组织中端粒随着每次分裂缩短。然而在生殖系组织中,端粒仍维持长度。端粒缩短已经被提出可以作为决定培养细胞的复制寿命标志(Harley et al. 1990;Harley 1991,本书)。培养的永生化的人体细胞受到危机后端粒酶被激活。用 T 抗原或其他病毒原癌基因转染的原生细胞起初表现端粒缩短和无端粒酶活性,但当培养细胞经历危机期过后,大多数细胞死亡,那些继续生长的细胞则具有端粒酶活性且端粒长度稳定(Counter et al. 1992,1994;Shay et al. 1993;Klingelhutz et al. 1994;Harley 本书;de Lange 本书)。这些实验表明端粒酶可能是永生化细胞生长所必需的。

端粒酶活性在人肿瘤中可检测到,而同一个体的大多数正常组织中没有,这表明端粒酶可能是抗癌疗法的一个靶子(Kim et al. 1994)。为检测小样本的人体组织,人们发明了一种灵敏的、基于 PCR 的端粒酶检测方法(Kim et al. 1994)。此检测方法原理是端粒酶会延伸非端粒序列的富含 G 的引物(TS),此引物是由人 α -贫血的愈合位点的染色体序列修饰而来(Wilkie et al. 1990;Morin 1991)。经过最初的端粒酶反应后,端粒酶产物用 TS 和(CCCTTA)₃ 引物扩增。此检测比传统的直接观察放射活性的端粒酶产物测定方法敏感 1000~10 000 倍。

虽然许多种人体组织缺乏可检测的端粒酶活性,但此酶在小鼠和蟾蜍的几种正常组织中存在活性(Mantell & Greider 1994;Prowse & Greider 1995)。目前还不清楚为何在这些种类中端粒酶调节水平不同,但有趣的是小鼠细胞在培养过程中自发永生化,而在人组织细胞中却很罕见。相对于小鼠来说也许在人组织中是额外水平的端粒酶抑制使得人细胞不能在培养的同时永生化(Prowse & Greider 1995)。

哺乳动物端粒酶 RNA

端粒酶活性在人类细胞永生化和癌症过程中潜在作用的研究,集中在克隆哺乳动物端粒酶组分上。因为人类细胞只有 92 个染色体末端,相反,四膜虫有 10 000 多个,游仆虫和其他尖毛虫有 100 000 多个。据推测人类端粒酶在每个细胞中只有几个端粒酶分子。当检测等量的提取物时,四膜虫的酶活性比人高 1000 倍,这进一步说明端粒酶在人类细胞中只存在低水平活性。因此,可以采用扩增含有可能模板序列 RNA 的方法克隆人 RNA 组分(J. Feng et al. 待发表)。从部分纯化的端粒酶和大小合适的总 RNA 中建立 cDNA 文库,对这些文库中进行了几轮筛选以寻找可能的 CTAACCCTA 模板序列。找到许多含有此序列的 RNA 并检测其是否能和端粒酶一起纯化,与模板区域互补的寡核苷酸是否能抑制其活性。最合适的候选 RNA 基因组位点被克隆,模板区域改造成可以合成 TTTGGG 或 TTGGGG 重复序列的端粒酶。用瞬时的转染和稳定的转化两种方法,在细胞提取物中检测突变的端粒酶活性。野生型人端粒酶活性可用在端粒酶反应中添加 ddATP 的方法抑制。分析表达突变 RNA 的细胞提取物时,TTTGGG 和 TTGGGG 重复序列的合成不被 ddATP 抑制(J. Feng et al. 待发表)。因此,正如用四膜虫和酵母端粒酶 RNA 那样,改变端粒酶 RNA 的模板区域则能改变合成的端粒重复序列。

和酵母的端粒酶 RNA 一样,人类端粒酶 RNA 远远大于纤毛虫 RNA。人端粒酶 RNA 大约含有 550 个核苷酸,并且以是否含有内部 T 残基片段的标准来判断它是否是

聚合酶Ⅲ的转录产物。端粒酶 RNA 未被聚腺苷酸化,其转录可由低水平的 α -鹅膏蕈碱抑制(Avilion 1995),这表明可能由 RNA 聚合酶Ⅱ的修饰形式所转录,此酶转录哺乳动物细胞的许多 U-snRNA 基因(Hernandez 1992)。

小鼠端粒酶 RNA 基因从一个基因组文库中用人的基因作探针得到克隆(M. Blasco et al. 待发表)。令人惊异的是,小鼠的 RNA 和人类 RNA 基因同源性仅有 58%,相反,其他小 RNA 在人和小鼠之间却高度保守。如在 U-RNA 种类中 U6 的同源性为 100%,U7 的同源性为 85%。小鼠和人 RNase P RNA 和 MRP RNA 同源性分别为 86%和 78%。因此,端粒酶 RNA 是目前鉴定的小鼠和人之间最不保守的哺乳动物的功能性 RNA。低水平的同源性在人和小鼠 RNA 的模板区域很广泛。有趣的是,小鼠的模板区域比人短,此缩短的模板可能在小鼠端粒酶较低水平的持续合成中起作用。小鼠端粒酶的解离几率可能比人的高,因为模板和端粒引物的互补程度较低。人和小鼠 RNA 突变分析,将更好地理解这两种哺乳动物之间的序列差异所致功能方面的影响。

因为小鼠 RNA 序列与人差距如此之大,提供直接的功能性证据,以证明此 RNA 是端粒酶活性所必需则显得非常重要。与覆盖模板区域的 RNA 互补的寡核苷酸特异性地抑制延伸,而一条 3' 末端紧邻模板的寡核苷酸被延伸,序列正对应于模板序列。这些结果正好与模拟寡核苷酸拮抗四膜虫端粒酶的发现一致(Greider & Blackburn 1989)。对小鼠 RNA 进行的研究表明,RNA 水平在发育过程中受严密的调控。新生小鼠在许多组织中表达端粒酶活性,但在成年,这些组织酶活性水平下调(M. Blasco et al. 待发表)。还不清楚此下调的含义何在,但是了解抑制的途径可能有助于揭开哺乳动物的端粒酶调节机理。

四膜虫端粒酶蛋白质

两种分子质量分别为 80kDa 和 95kDa 的蛋白质近来得到鉴定,它们可能为四膜虫端粒酶蛋白质组分(Collins et al. 1995)。采用抗 p80 蛋白质抗体,端粒酶可以被特异性地免疫沉淀。Western 分析沉淀部分显示 p95 与 p80 的活性部分共沉淀,表明两种蛋白质参与影响端粒酶活性。在基因库中 p80 与 p95 和其他蛋白质没有明显的同源性。p80 含有一个锌指结构,可能参与 RNA 或 DNA 结合。p95 的一个区域可以和两种不同类别的聚合酶活性位点基序校准:依赖 RNA 的 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶 α 和 β (Poch et al. 1989; Delarue et al. 1990)。端粒酶与其他任何已知的聚合酶无同源性,再加上存在这些基序区域,这说明端粒酶是一类新的聚合酶(Collins et al. 1995)。依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶被认为是最早认识的聚合酶之一(Lazcano et al. 1988; Poch et al. 1989),如果端粒酶确实与此类聚合酶最相近,那么说明端粒酶可能在进化早期即从其他聚合酶分化出来了。

端粒酶细胞周期调节

端粒酶通过补偿复制过程中的序列丢失而维持端粒长度。端粒延伸发生在细胞周期的 S 期,因为此时其他与复制有关的酶被激活,但是还没有一个明显的原因支持端粒酶必须在此时激活。少量的新生成 DNA 用检测细胞周期中新合成 DNA 的方法检测不到。在酵母中,S 期一段单链端粒 TG₁₋₃ 区域特异性地出现在端粒上(Wellinger et al. 1993)。此

单链 DNA 被认为由酵母端粒酶以一种细胞周期依赖的方式合成。现在可以在端粒酶 RNA 缺失菌株中直接搜索此序列。

在脊椎动物细胞中端粒酶活性存在于细胞周期的所有阶段。蟾蜍 S 期的提取物没有 Cdc2 激酶活性,而 M 期提取物有高 Cdc2 激酶活性,但两个阶段都有相似水平的端粒酶活性(Mantell & Greider 1994)。人类 HeLa 细胞和小鼠 3T3 细胞在 S 期用羟基脲或在 M 期用噻氨酯吡唑(nocodazole)同步处理也有相似水平的端粒酶活性(Avilion 1995; K. Buchkovich & C. W. Greider 未发表)。在由于去除血清或生长过于密集而处于生长停止期的小鼠细胞中,端粒酶活性水平和那些处于对数生长期的细胞相同。最近的证据显示端粒酶活性在原初人淋巴细胞中也存在(C. Harley & C.-P. Chiu 个人通讯)。在这些淋巴细胞中,端粒酶活性存在于细胞 S 期但不在 G₀ 期(K. Buchkovich & C. W. Greider 未发表)。在永生化细胞和原初淋巴细胞中不同的调节方式可能反映了这些细胞中端粒酶被激活的时间顺序(Harley 本书; de Lange 本书)。

展望

自 10 年前发现端粒酶以来,对这种新的、端粒特异性的 DNA 聚合酶的机理已经有了许多了解。虽然人们已经解答了酶的生物化学和调节的问题,但最近端粒酶研究的进展又提出了更多的问题。在下一个 5 年中,我希望看到一些主要的问题得到回答。

尽管端粒酶像反转录酶一样把 RNA 拷贝成 DNA,但端粒酶的一些特性更像 RNA 聚合酶。有人提出把序列添加到线形染色体末端的机制是进化早期“RNA 世界”的残留现象,因此端粒酶可能是一种古老的聚合酶(Weiner & Maizels 1987; Maizels & Weiner 1993)。端粒酶蛋白质组分的克隆说明端粒酶可能代表一个新的聚合酶家族。利用这些克隆的蛋白质,许多有关端粒酶作用机制的遗留问题,如引物识别的特异性、延伸的空间阻碍、易位,可能被直接解决。由于端粒酶催化的聚合步骤和许多其他聚合酶类似,所以应把端粒酶催化的联合步骤作为研究的主要方面。

在端粒长度调节过程中端粒酶到底起什么作用?体内端粒酶持续合成的调节能有助于确定端粒的最终长度吗?或者长度调节是否主要由其他机制决定,例如端粒结合蛋白质的亲和力大小?端粒酶活性在自发或发育染色体愈合过程中发生改变吗?在四膜虫中,体外实验发现,端粒被有效地添加到不良的端粒酶底物序列上,在发育过程中有改变端粒酶特异性的辅助因子被诱导吗?

哺乳动物细胞中端粒酶调节在近期将取得很大的进展。端粒酶是永生化细胞生长所必需的吗?人和小鼠端粒酶缺失或端粒酶被抑制的结果怎样?有一个和酵母 *est1* 或端粒酶 RNA 敲除时相同的旁路生存途径存在吗?端粒酶是人类干细胞增殖所必需的吗?对这些问题的解答将影响抗端粒酶方法作为可能的癌症治疗手段。

在小鼠组织中存在端粒酶活性,而在人体许多组织中缺乏该活性。这为我们提供了一条了解端粒酶调控的线索。端粒酶活性是受一种特异的酶抑制因子调节的吗?酶存在的调节是通过转录激活的吗?人们将采用许多不同的实验手段来回答这些问题。既然过去 10 年中在端粒酶研究中有如此多的发现,所以所有此领域的科学家在研究端粒酶时应该敞开思想,勇于探索。但迄今为止,无论从生物化学或是调控的角度来看都不能适合任何

已知的模型,因此现在没有理由相信在将来端粒酶会按一种可以预知的方式起作用,所以系好你的安全带,我们将开始一个有趣的旅程。

致谢

感谢 Chantal Autexier、Kathleen Collins 和 Stephanie Smith 的审稿,还感谢 Elizabeth Blackburn 的帮助并在出版前分享数据。这一章中所描述的我的实验室工作部分是由国家卫生署的第 GM-43080 和 AG-09383 号基金资助。

参考文献

- Ares, M. 1986. U2 RNA from yeast is unexpectedly large and contains homology to vertebrate U4, U5 and U6 small nuclear RNAs. *Cell* 47: 49-59.
- Autexier, C. and C.W. Greider. 1994. Functional reconstitution of wild type and mutant *Tetrahymena* telomerase. *Genes Dev.* 8: 563-575.
- Avilion, A.A. 1995. "Characterization and expression of human telomerase RNA." Ph.D thesis, State University of New York, Stony Brook.
- Bernards, A., P.A.M. Michels, C.R. Lincke, and P. Borst. 1983. Growth of chromosomal ends in multiplying trypanosomes. *Nature* 303: 592-597.
- Bhattacharyya, A. and E.H. Blackburn. 1994. Architecture of telomerase RNA. *EMBO J.* 13: 5521-5531.
- Black, D.L., B. Chabot, and J.A. Steitz. 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. *Cell* 42: 737-750.
- Blackburn, E.H. and J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120: 33-53.
- Blackburn, E.H. and J.W. Szostak. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 163-194.
- Budarf, M.L. and E.H. Blackburn. 1986. Chromatin structure of the telomeric region and 3'-nontranscribed spacer of *Tetrahymena* ribosomal RNA genes. *J. Biol. Chem.* 261: 363-369.
- Carson, M. and L. Hartwell. 1985. CDC 17: An essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell* 42: 249-257.
- Chamberlin, M.J. 1992. New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation. *Harvey Lect.* 88: 1-21.
- Cohn, M. and E.H. Blackburn. 1995. Telomerase in yeast. *Science* (in press).
- Collins, K. and C.W. Greider. 1993. *Tetrahymena* telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and non-processive elongation. *Genes Dev.* 7: 1364-1376.
- Collins, K., R. Koybayashi, and C.W. Greider. 1995. Purification of *Tetrahymena* telomerase and cloning of the genes for the two protein components of the enzyme. *Cell* (in press).
- Counter, C.M., F.M. Botelho, P. Wang, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1994. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* 68: 3410-3414.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921-1929.
- Delarue, M., O. Poch, N. Tordo, and P. Argos. 1990. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* 3: 461-467.
- Dunn, B., P. Szauter, M.L. Pardue, and J.W. Szostak. 1985. Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* 39: 191-201.
- Gilley, D., M. Lee, and E.H. Blackburn. 1995. Telomerase RNA residues play critical

- roles in active site function. *Genes Dev.* (in press).
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, and V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of pol II transcription. *Cell* 63: 751–762.
- Greider, C.W. 1991. Telomerase is processive. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4572–4580.
- Greider, C.W. and E.H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405–413.
- . 1987. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887–898.
- . 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331–337.
- Harley, C.B. 1991. Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 256: 271–282.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458–460.
- Harrington, L.A. and C.W. Greider. 1991. Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* 353: 451–454.
- Henderson, E. and E.H. Blackburn. 1989. An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 9: 345–348.
- Henikoff, S. 1990. Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* 6: 422–426.
- Hernandez, N. 1992. Transcription of vertebrate snRNA genes and related genes. In *Transcriptional regulation* (ed. S.L. McKnight and K.R. Yamamoto), book 1, pp. 281–313. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Igel, A.H. and M. Ares. 1988. Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-RNA splicing. *Nature* 334: 450–453.
- Izban, M.G. and D.S. Luse. 1993. SII-facilitated transcript cleavage in RNA polymerase II complexes stalled early after initiation occurs in primarily dinucleotide increments. *J. Biol. Chem.* 268: 12864–12873.
- Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011–2014.
- Klingelhutz, A.J., S. Barber, P.P. Smith, K. Dyer, and J.K. McDougall. 1994. Restoration of telomeres in human papillomavirus-immortalized human anogenital epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 14: 961–969.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3015–3019.
- Krainer, A.R. and T. Maniatis. 1985. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42: 725–736.
- Kramer, K.M. and J.E. Haber. 1993. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes Dev.* 7: 2345–2356.
- Larson, D.D., E.A. Spangler, and E.H. Blackburn. 1987. Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena thermophila*. *Cell* 50: 477–483.
- Lazcano, A., J. Fastag, P. Gariglio, C. Ramirez, and J. Oro. 1988. On the early evolution of RNA polymerase. *J. Mol. Evol.* 27: 365–376.
- Lee, M.S. and E.H. Blackburn. 1993. Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6586–6599.
- Lin, J.-J. and V.A. Zakian. 1995. An in vitro assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell* (in press).
- Lingner, J., L.L. Hendrick, and T.R. Cech. 1994. Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev.* 8: 1984–1998.
- Lundblad, V. and E.H. Blackburn. 1993. An alternative pathway for yeast telomere

- maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73: 347-360.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57: 633-643.
- Lustig, A.J. and T.D. Petes. 1986. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 1398-1402.
- Lustig, A.J., S. Kurtz, and D. Shore. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* 250: 549-552.
- Maizels, N. and A.M. Weiner. 1993. The genomic tag hypothesis: Modern viruses as molecular fossils of ancient strategies for genomic replication. In *The RNA world* (ed. R.F. Gesteland and J.F. Atkins), pp. 577-602. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mantell, L.L. and C.W. Greider. 1994. Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *EMBO J.* 13: 3211-3217.
- McCormick-Graham, M. and D.P. Romero. 1995. Ciliate telomerase RNA structural features. *Nucleic Acids Res.* 23: 1091-1097.
- McEachern, M.J. and E.H. Blackburn. 1994. A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3453-3457.
- . 1995. Runaway telomeres caused by telomerase RNA gene mutations in the yeast *K. lactis*. *Nature* (in press).
- McEachern, M.J. and J.B. Hicks. 1993. Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 551-560.
- Melek, M., B. Davis, and D.E. Shippen. 1994. Oligonucleotides complementary to the *Oxytricha nova* telomerase RNA delineate the template domain and uncover a novel mode of primer utilization. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7827-7838.
- Morin, G.B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59: 521-529.
- . 1991. Recognition of a chromosome truncation site associated with α -thalassaemia by human telomerase. *Nature* 353: 454-456.
- Olovnikov, A.M. 1973. A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* 41: 181-190.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8: 3867-3874.
- Prowse, K.R. and C.W. Greider. 1995. Developmental and tissue specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press).
- Prowse, K.R., A.A. Avilion, and C.W. Greider. 1993. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1493-1497.
- Raghuraman, M.K. and T.R. Cech. 1989. Assembly and self-association of *Oxytricha* telomeric nucleoprotein complexes. *Cell* 59: 719-728.
- Raghuraman, M.K., C.J. Dunn, B.J. Hicke, and T.R. Cech. 1989. *Oxytricha* telomeric nucleoprotein complexes reconstituted with synthetic DNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 4235-4253.
- Romero, D.P. and E.H. Blackburn. 1991. A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67: 343-353.
- Shampay, J., J.W. Szostak, and E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154-157.
- Shay, J.W., W.E. Wright, D. Brasiskyte, and B.A. Van der Hagen. 1993. E6 of human papilloma type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* 8: 1407-1413.
- Sheng, H., H. Zhen, D.L. Dobbs, and E. Henderson. 1995. Identification and characterization of a putative telomere end binding protein from *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* 15: 1144-1153.
- Shippen, D.E., E.H. Blackburn, and C.M. Price. 1994. DNA bound by the *Oxytricha* telomere protein is accessible to telomerase and other DNA polymerases. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* **91**: 405–409.
- Shippen-Lentz, D. and E.H. Blackburn. 1989. Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2761–2764.
- . 1990. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* **247**: 546–552.
- Singer, M.S. and D.E. Gottschling. 1994. TLC1: Template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404–409.
- Sogin, M.L., A. Ingold, M. Karlok, H. Nielsen, and J. Engberg. 1986. Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. *EMBO J.* **5**: 3625–3630.
- Spangler, E.A. and E.H. Blackburn. 1988. Developmentally regulated telomere addition in *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 5569.
- Surratt, C.K., S.C. Milan, and M.J. Chamberlin. 1991. Spontaneous cleavage of RNA in ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase and its significance for the mechanism of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7983–7987.
- ten Dam, E., A. van Belkum, and K. Pleij. 1991. A conserved pseudoknot in telomerase RNA. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6951.
- Walmsley, R.W., C.S.M. Chan, B.-K. Tye, and T.D. Petes. 1984. Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* **310**: 157–160.
- Watson, J.D. 1972. Origin of concatameric T4 DNA. *Nat. New Biol.* **239**: 197–201.
- Weiner, A.M. and N. Maizels. 1987. tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: Implications for the origin of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 7383–7387.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51–60.
- Wilkie, A.O., J. Lamb, P.C. Harris, R.D. Finney, and D.R. Higgs. 1990. A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* **346**: 868–871.
- Williamson, J.R., M.K. Raghuraman, and T.R. Cech. 1989. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* **59**: 871–880.
- Yao, M.-C. 1989. Site specific chromosome breakage and DNA deletion in ciliates. In *Mobile DNA* (ed. D.E. Berg and M.M. Howe), pp. 715–743. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Yu, G.-L. and E.H. Blackburn. 1991. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* **67**: 823–832.
- Yu, G.-L., J.D. Bradley, L.D. Attardi, and E.H. Blackburn. 1990. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* **344**: 126–132.
- Zahler, A.M. and D.M. Prescott. 1988. Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6953–6972.
- Zahler, A.M., J.R. Williamson, T.R. Cech, and D.M. Prescott. 1991. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**: 718–720.
- Zakian, V.A. 1989. Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 579–604.

第四章 端粒蛋白质

Guowei Fang & Thomas R. Cech

Howard Hughes Medical Institute

Department of Chemistry and Biochemistry

University of Colorado

Boulder, Colorado 80309-0215

端粒是在线性染色体末端发现的 DNA 蛋白质复合物。当第一个端粒 DNA 序列测定出来时(Blackburn & Gall 1978),人们更注重研究其 DNA 组成,取得了很大的成果,并发现了端粒复制酶——端粒酶(Greider 本书;Blackburn 本书)。然而,单从 DNA 序列的角度去理解端粒的功能还不够,还必须了解它的蛋白质组成。

端粒蛋白质能与端粒 DNA 上的特异序列相结合(见图 4-1)。它们可以为染色体末端加帽,防止核酸降解和末端与末端的结合,从而保证染色体的稳定性。它们还参与染色体的定位、核的结构和对附近基因表达的抑制等活动。端粒蛋白质可能还影响端粒 DNA 与端粒酶的接触。本章中我们将综述这些顺式作用蛋白质因子的结构和功能,包括它们与端粒 DNA 的相互作用、与别的蛋白质和核结构的相互作用以及它们对端粒功能的调解作用。

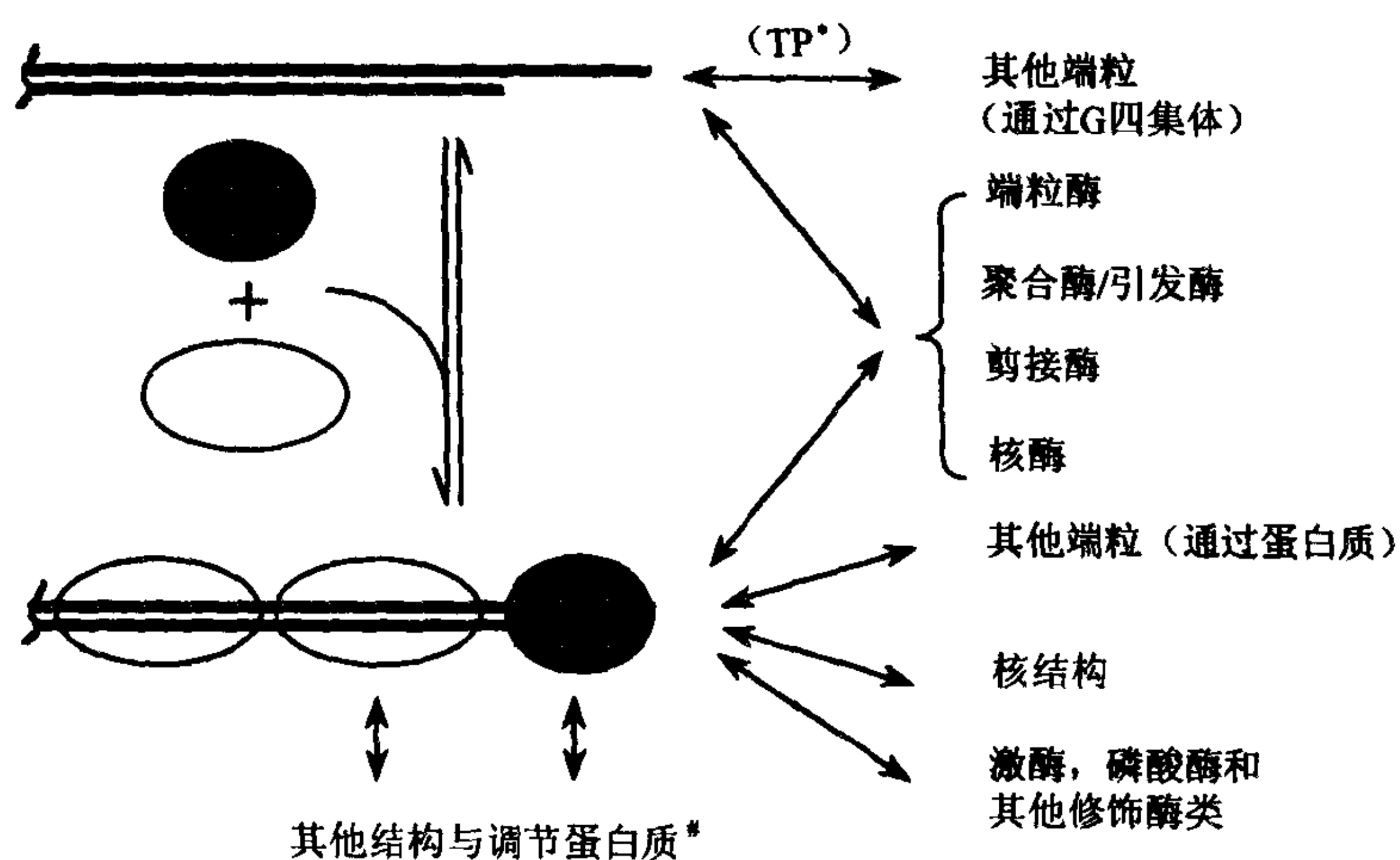


图 4-1 端粒 DNA、端粒蛋白和核因子之间的相互作用

深色的圆圈代表与单链端粒 DNA (G 链) 结合的蛋白质。白色的椭圆代表与双链端粒 DNA 结合的蛋白质。粗线代表染色体 DNA, 悬突代表单链端粒 DNA。* 端粒 DNA 可以通过 G 四集体发生自身连接。端粒蛋白质(TP), 例如尖毛虫端粒蛋白和 RAP1, 可以促进这些结构的形成。* 端粒蛋白质与其他结构或调节蛋白相互作用。例如, RAP1 与 SIR3 和 SIR4 或 RIF1 之间的相互作用。

端粒 DNA 通常由串联的重复序列组成,其中有一条链富含鸟嘌呤核苷酸(Henderson 本书)。该链方向总是从 5'到 3',直至染色体的末端。例如,人端粒有一个 T_2AG_3 的重复序列,尖毛虫端粒具有 T_4G_4 重复序列,四膜虫的端粒有 T_2G_4 重复序列,酵母端粒的重复序列不很规则,由 Ts 和 Gs 组成,大约为 $TG_{1\sim3}$ 。不同物种的端粒 DNA 长度差别很大。下毛亚目纤毛虫巨核 DNA 分子的端粒 DNA 很短,长度比较一致[尖毛虫和棘毛虫的端粒为 20bp 的双链区;在游仆虫则为 28bp (Oka et al. 1980; Klobutcher et al. 1981)]。四膜虫和酵母的端粒则含有几百个碱基对,长度也不统一(Blackburn & Gall 1978; Shampay et al. 1984; Wang & Zakian 1990);而哺乳动物端粒的长度介于几千到几十万个碱基对之间(Allshire et al. 1988; Moyzis et al. 1988; Kipling & Cooke 1990; Starling et al. 1990)。所以不同的生物调节端粒长度的机制可能不同。

端粒 DNA 中富含 G 的链伸出形成 3' 悬突,长度约为两个重复单位,这可以存在于进化程度不同的生物体内,如尖毛虫、游仆虫、四膜虫和钙皮菌属(*Didymium*) (Klobutcher et al. 1981; Henderson & Blackburn 1989)。这样,尖毛虫有一个 $T_4G_4T_4G_4$ 单链悬突,游仆虫有一个 $T_4G_4T_4G_2$ 的悬突。最近发现酵母端粒可以在 S 期的晚期获得单链的 $TG_{1\sim3}$ 尾(Wellinger et al. 1993)。因此 3' 单链悬突可能是端粒的一个普遍的特征。

单链端粒 DNA 能够通过 G 四集体形成更加有序的结构(Henderson 本书)。一个 G 四集体由 4 个鸟嘌呤组成,排列成平面四方形结构,在 Hoogsteen 碱基配对中,每个鸟嘌呤可以作氢键受体和供体(Gellert et al. 1962; Zimmerman et al. 1975)。含有 4 个端粒重复序列的寡核苷酸可以通过分子内 G 四集体自身折叠,含两个富含 G 端粒序列重复单位的寡核苷酸可以通过 G 四集体形成二聚体(Henderson et al. 1987; Sundquist & Klug 1989; Williamson 1989)。富含 G 的寡聚核苷酸序列和那些富含 G 的端粒序列都能够形成平行的四链 G 四集体结构(Sen & Gilbert 1988,1990)。

本章中,我们首先描述端粒染色质结构,然后重点介绍两类端粒 DNA 结合蛋白(见图 4-1)。第一类是能与端粒末端富含 G 的单链 DNA 发生特异结合的蛋白质;第二类是能够与端粒 DNA 双链区进行特异性作用的蛋白质。我们对每一类蛋白质中的一种进行详细的介绍:尖毛虫末端结合蛋白,可以与端粒 DNA 3' 端的单链悬突特异结合;酵母 RAP1 蛋白质,可以与端粒 DNA 的双链区反应。我们还简要介绍生物化学中相关的最新发现,如端粒蛋白有助于 G 四集体形成(见图 4-1),这些新的发现为这些 DNA 结构之间的联系提供了新的证据。

端粒的非核小体染色质结构

端粒 DNA 与结构蛋白质相互作用。在四膜虫巨核中,端粒 DNA 不能被微球菌核酸酶所消化(Blackburn & Chiou 1981; Budarf & Blackburn 1986)。这种受保护的片段在长度上有很大的差别,介于 200bp 到 800bp 间,平均为 300bp,比期望的核小体保护片段要长一些。在同样的条件下,大部分染色体 DNA 都会被消化成单或寡核小体。此外,受保护的、与相关蛋白质结合的端粒 DNA 在氯化钾中的溶解度与核小体的溶解度相比有很大的不同。这样,四膜虫巨核染色体的末端不是核小体结构,很可能是由其他蛋白质而不是由组蛋白装配的。

在尖毛虫中,人们利用微球菌核酸酶消化和甲锭丙基(methidiumpropyl)-EDTA·Fe(I)切割法研究了DNA与蛋白质在巨核DNA分子末端的相互作用(Gottschling & Cech 1984)。DNA末端约有100~150bp没有被切割,该片段长度小于核小体中平均DNA长度(约为200bp)。末端DNA蛋白质复合物几乎见于所有的巨核DNA中,并且DNA分子中的两端都受到保护。末端复合物异常的盐稳定性说明复合物中的蛋白不是组蛋白。末端区的内部是相位核小体(phased nucleosome)。这种核小体从DNA分子末端开始至少扩展到1500bp。在四膜虫,相位核小体还见于染色体外rDNA分子与端粒相连区域(Gottschling & Cech 1984; Budarf & Blackburn 1986)。在盘基网柄菌(Edwards & Firtel 1984)、绒泡菌属(Lucchini et al. 1987)和游仆虫(Price 1990)中还发现有端粒DNA的非核小体装配结构。

酿酒酵母的亚端粒区(X和Y'元件)(Zakian 本书)是以核小体形式装配的。而末端TG₁₋₃重复序列是以非核小体颗粒[称做端体(telosome)]的形式装配的(Wright et al. 1992)。端体DNA(245~395bp)约为核小体DNA含量的两倍(酵母中为160bp),包括了整个末端TG₁₋₃序列。不同生物间端体长度的差异(跨度为150bp)可能是由于端粒DNA长度的不一致所造成的。端体与相连的核小体间的边界含有DNA酶I的超敏感位点,当大肠杆菌(*Escherichia coli*)dam甲基化酶在酵母中表达时,连接区很容易甲基化。因此,这个连接区不可能与蛋白质密切相连。

与纤毛虫和酵母的端粒相比,微球菌核酸酶消化表明大鼠端粒的大部分(>75%,长20~100kb)装配成紧密的核小体(Makarov et al. 1993)。端粒染色质核心粒子与核小体核心粒子在核酶的敏感性、电泳和流体力学特性等方面极为相似。但连接端粒和核小体间的连接区比大量的染色质中的连接区要短一些。多细胞和单细胞真核生物的端粒在长度上是不同的。酵母和四膜虫端粒的长度只有几百个碱基,而哺乳动物的端粒长为5~150kb。因为大鼠端粒中最末端的几百个碱基对只是其端粒很小的一部分,所以在纤毛虫和酵母中出现非核小体端粒结构,而在大鼠中没有这样的结构。造成两者间明显差异的原因可能是由于我们很难测定出大鼠端粒最末端染色质结构。最近这一观点在人培养细胞进行的端粒染色质研究中得到证实(Tommerup et al. 1994)。带有14~150kb端粒重复序列的人类端粒被证明是被装配成紧密的核小体。然而,相对较短的人类端粒(2~7kb)已经改变了染色质结构,于是在微球菌核酸酶消化下,随着其周期的缩短,则会产生一个递减的梯式结构,而不是核小体的三联体结构。人类端粒末端的几个kb末端区内或甚至在更长的端粒内,都很可能存在无核小体的区域。

单链端粒DNA结合蛋白

尖毛虫端粒蛋白

人类关于末端特异性蛋白的知识主要来自于对下毛亚目纤毛虫端粒蛋白的研究,特别是对新种尖毛虫的研究,因为这种生物具有大量的端粒。每一个尖毛虫巨核中含有约24 000种不同大小的DNA分子,每种分子约有1000个拷贝,也就是说具有4800万个端粒(Klobutcher & Prescott 1986)。所以尖毛虫为研究端粒中DNA与蛋白质间相互作用

的生物化学特性提供了理想的模型。

新种尖毛虫中每个巨核 DNA 分子都具有相同的端粒序列(Klobutcher et al. 1981):

---GGGGTTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGGG 3'

---CCCCAAAACCCCAAACCCC5'

图中的短线表示每一基因特有的非端粒序列。正如上文中所述的那样,巨核染色体末端的 100~150bp 序列是以非核小体 DNA-蛋白质复合物形式存在的(Gottschling & Cech 1984)。对分离的巨核进行 DNA 酶 I 足迹实验表明,从末端起的 45~135bpDNA 位于蛋白质的表面(Price & Cech 1987)。现在还不清楚这种蛋白质是否为核心组蛋白的一个亚群,或是一种新的 DNA 结合蛋白。在完整细胞和巨核上进行的硫酸二甲脂(dimethyl sulfate, DMS) 足迹实验表明,3' 单链悬突 T₄G₄T₄G₄ 中的特定 G 残基受到了保护而免于甲基化,并且末端 DNA 与蛋白质间的相互作用与距末端约 45~135bp 区域内所发生的情况不同。

端粒最末端的 DNA 与蛋白质相互作用,在 2mol/L 的氯化钠溶液中是稳定的,这为纯化蛋白质成分提供了极大的方便(Gottschling & Zakian 1986)。生化实验表明,末端结合蛋白质(端粒蛋白质)是由 56kDa 的 α 亚基和 41kDa 的 β 亚基组成。这种蛋白质能特异地与每一个巨核 DNA 末端的单链 T₄G₄T₄G₄ 悬突结合,形成端粒复合物。端粒蛋白质使 DNA 不受 BAL 31 外切核酸酶、DNA 酶 I 和微球菌核酸酶的消化(Gottschling & Zakian 1986; Price & Cech 1987, 1989)。

一级结构

人们已经纯化了尖毛虫端粒蛋白并进行了部分的测序,还根据有关肽链序列的信息克隆出了编码 α 和 β 亚基的巨核基因(Hicke et al. 1990; Gray et al. 1991)。每个亚基基因至少含有两个“版本”(version),在它们核酸序列中只有几十个位点的差别。在氨基酸水平上,只有一个(α 亚基)或两个(β 亚基)位点的差别。现在我们还不知道这种变异是否代表不同的基因座,或是代表同一基因座的等位基因,所以我们采用了“版本”这个词。通过 DNA 印迹分析, β 基因的两个版本以相等的水平存在。对新种尖毛虫 cDNA 的序列分析表明,至少 α 基因的两个版本都能表达。最近,人们发现了 α 基因的第三个版本,说明至少存在两个完全不同的基因座。

每一个巨核亚基基因含有一个短的内含子(见图 4-2)。 α 基因的第一个外显子编码 35 个氨基酸,富含赖氨酸;第二个大的外显子编码比例均匀的氨基酸(Gray et al. 1991)。预测的氨基酸序列并不能揭示任何已知的序列特异性 DNA 结合位点,所以 α 亚基可能是一种新型的、与单链 DNA 特异序列结合的蛋白质。

对于 β 基因,第一个外显子编码从氨基端开始的三分之一蛋白序列,并且包含一个由 15 个氨基酸组成的疏水链(Hicke et al. 1990)。 β 基因第二外显子编码一个富含赖氨酸的亲水多肽,其序列与组蛋白 H1 略有相似(见图 4-2)。尽管 β 亚基的一小段肽链与在一类 RNA 结合蛋白上所发现的 RNA 识别基序相同(Bandziulis et al. 1989),但在假定的同源区域发生了双突变的 β 亚基仍能有效地形成端粒复合体(Hicke et al. 1994)。

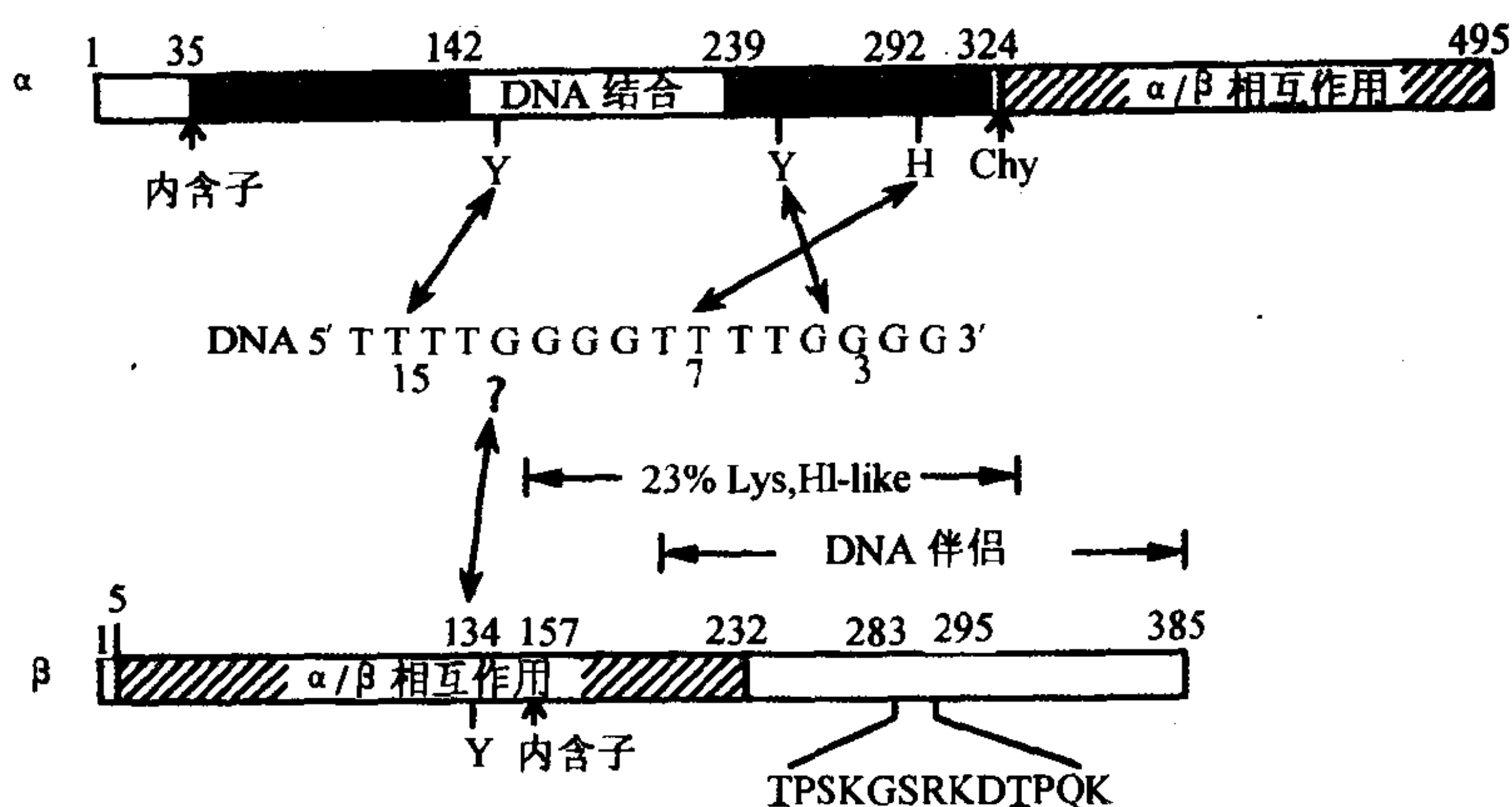


图 4-2 通过交联研究鉴定的位于端粒 DNA 近端的尖毛虫端粒蛋白质的结构域和氨基酸残基

其中 β 亚基中第 152 个到第 326 个氨基酸之间的区域与组蛋白 H1 具有相似性。 β 亚基的羧基端(氨基酸为 199~385)可以作为 DNA 伴侣,促进分子内 G 四集体的形成。 β 亚基中的 134 的 Tyr 在紫外线照射下可以与端粒寡聚核苷酸形成交联,现在还没能确定 DNA 上的交联位点(Hicke et al. 1994)。 β 亚基可以在体外被 p34^{cdc2} 同系物磷酸化,图中标有下划线的部分为磷酸化的常发点,Chy 是胰凝乳蛋白酶切开位点。

端粒复合物的化学计量、序列特异性和稳定性

人们最初对蛋白质结合的化学计量研究是在甲基化足迹实验中通过蛋白质浓度滴定方法进行的(Gray et al. 1991)。人们发现合成的寡聚核苷酸端粒复合物含有等摩尔的 α 、 β 和 DNA。复合物的物理成分,是以电泳时不同融合蛋白质和 DNA 分子混合在一起所形成的端粒复合物的数量来测定的(Fang & Cech 1993a)。I 型单纯疱疹病毒 VP16 活化区的酸性很强,能与 α 或 β 亚基融合,融合后使肽链的负电性增加,端粒复合物的泳动速度也会加快。通过采用这些嵌合蛋白质和不同长度的 DNA 探针,检出端粒复合物含有一个 α 亚基、一个 β 亚基和一个 DNA 寡核苷酸。

端粒蛋白特异地与巨核 DNA 的两端结合。体外重建(reconstitution)实验表明,对巨核 DNA 或含有 T₄G₄ 重复序列的寡核苷酸加入纯化的端粒蛋白,能重建一个端粒复合物,且具有 DMS 甲基化足迹模式,与体内的模式完全相同(Price & Cech 1987; Raghuraman & Cech 1989; Raghuraman et al. 1989; Gray et al. 1991)。DNA 结合具有序列特异性,如果序列中 T 变成 A 或 G 变成 C,这将会破坏 DNA 与蛋白质间的相互作用(Raghuraman et al. 1989)。从尖毛虫细胞中纯化得到的端粒蛋白质,在体外并不与完全折叠成 G 四集体形式的端粒 DNA 结合(Raghuraman & Cech 1990)。

重组的 α 亚基本身就可以识别单链 DNA 的 T₄G₄ 序列(Gray et al. 1991)。它对位于 DNA 3' 端的 T₄G₄ 序列有较强的亲和力。但是在低盐浓度和蛋白质过剩时, α 亚基与寡核苷酸中单个或每一 T₄G₄ 重复序列都能结合。 β 亚基与端粒 DNA 无特异性的结合,但它能与 α ·DNA 的二聚体复合物作用并以与体内端粒相同的甲基化足迹的形式形成三聚体复合物(Price & Cech 1987)。在没有 α 亚基存在的情况下, β 亚基自身能促进端粒 DNA G

四集体形成(见下文)。

尖毛虫端粒蛋白与 $T_4G_4T_4G_4$ 悬突的非共价键结合是很牢固的(Gottschling & Zakian 1986; Price & Cech 1987)。端粒复合物在多数情况下是稳定的(Price & Cech 1989);例如,一段端粒 DNA 在核酶长时间消化后,仍保持与蛋白质的结合。端粒复合物一旦形成,在 2.5mol/L NaCl 和 6mol/L CsCl 中就很稳定(Gottschling & Zakian 1986; Price & Cech 1989; Raghuraman & Cech 1990)。这种对盐溶液超常的稳定性表明,疏水作用在端粒复合中起着重要的作用。

$\alpha \cdot$ DNA 二聚体复合物与 $\alpha \cdot \beta \cdot$ DNA 三聚体复合物有着完全不同的动力学稳定性(Raghuraman & Cech 1989; Fang et al. 1993)。二聚体复合物的解聚半衰期少于 1min,加入 β 亚基后半衰期达到约 100h。因此, β 亚基大大地稳定了端粒复合物。端粒复合物的半衰期,与其他 DNA · 蛋白质复合物相比是非常长的,后者最短的少于 1s(T4 基因 32 蛋白 · DNA 复合物)(Lohman 1984),最长为 10h(RNA 聚合酶 · T7 启动子复合物)(Cech & McClure 1980)。三聚体复合物超常动力学稳定性与体内端粒蛋白质的保护作用是一致的。

亚基与亚基间的相互作用

α 和 β 亚基在没有端粒 DNA 存在时都是以单体形式存在的(Fang & Cech 1993a)。在端粒复合物中,两个亚基可以化学交联形成异源二聚体(heterodimer),这样它们可以直接作用(Price & Cech 1989; Fang & Cech 1993a)。所以, $\alpha \cdot \beta$ 异源二聚体的形成依赖于 DNA。与此相一致,定量结合研究表明 α 与 β 亚基与端粒 DNA 能够协同地结合在一起(Fang et al. 1993)。 $\alpha \cdot \beta \cdot$ DNA 三聚体复合物的解聚常数为 $2n(\text{mol/L})^2$, $\alpha \cdot$ DNA 二聚体复合物的解聚常数为 125nmol/L, $\beta \cdot$ DNA 二聚体复合物的解聚常数为 4mmol/L,因此 α 与 β 亚基共同结合比单独一种亚基与 DNA 结合得更紧密。

形成 DNA 依赖性二聚体复合物有什么样的生物学意义呢?人们发现 α 和 β 亚基具有相互独立的活性。 α 亚基能够在体外沿着单链的端粒 DNA 与每一个 T_4G_4 重复序列结合,说明 α 亚基能在体内保护每一个新合成的端粒重复序列。 β 亚基能够促进 G 四集体结构的形成。DNA 依赖性二聚体复合物中每一个亚基除了参与三聚体复合物的作用外,还执行自身独特的功能(Fang & Cech 1993a)。另一方面 DNA 依赖性的二聚体复合物也可能提供一个调节三聚体复合物的一种机制。一旦三聚体复合物中的一个亚基被取代,或者通过磷酸化作用(Hicke 1993; 见下文),或者是通过与调节因子相互作用,那么整个复合物就会由于二聚体复合物的动力学不稳定性而解聚。这会使其他成分进入并与端粒发生反应,如端粒酶,它可以使染色体 3' 末端延长,还有端粒蛋白的 β 亚基,它可以促进端粒 DNA G 四集体的形成。

结构域

通过大量的缺失分析,人们已经绘出了每一个亚基的结构域图谱(Fang et al. 1993)。与很多转录因子一样, α 亚基含有两个结构独立的、各具有不同功能的结构域(见图 4-2)。氨基末端的 2/3 肽段对于和序列特异 DNA 结合来说是必要的,也是充分的。而羧基端的 1/3 肽段与 α/β 亚基的相互作用有关。然而,与转录活化因子不同,这两个结构

域在大肠杆菌中分别表达纯化后再混合在一起,仍能重建野生型 α 亚基的活性,很有可能是因为形成稳定的结构域与结构域间作用。在非变性条件下,用胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶蛋白水解 α 亚基,将产生两个片段。这两个片段与用缺失分析法测定出来的两个功能性结构域相一致(见图 4-2)(J. Ruggles & S. Schultz 个人通讯)。

β 亚基氨基末端的 2/3 肽段对于 α/β 亚基间相互作用和形成三聚体复合物来说都是必要的(见图 4-2)(Fang et al. 1993)。 β 亚基的羧基末端对于三聚体复合物的形成来说是必不可少的。在非变性条件下,这个区域易受到蛋白水解作用而断裂(Gottschling & Zakian 1986; Price & Cech 1987; J. Ruggles & S. Schultz 个人通讯)。这样, β 亚基的这个区域,还可以从三聚体复合物或它的残基表面扩展出来形成一个独立的结构域。最近的研究表明,羧基末端这个区域是促使 G 四集体形成的必要部分(见图 4-2)(Fang & Cech 1993b, 1993c)。蛋白质的这一区域也可能参与单体端粒复合物的自联(self-association)(Raghuraman & Cech 1989; Fang et al. 1993)和体内端粒间的连接(Lipps et al. 1982; Prescott 1983; 见下文),这一过程是通过蛋白与蛋白间作用或 DNA 与蛋白间作用而实现。

序列分析表明,在 α 亚基间相互作用的结构域有 3 个 7 氨基酸重复序列,这 7 个氨基酸为疏水残基(Leu-461、Leu-468、Val-475)。 β 亚基也含有短的 7 氨基酸重复区(Leu-83、Ile-90、Leu-97)。曾有人提出, α/β 亚基间的作用可能是由这些 7 氨基酸重复序列所介导的(Fang et al. 1993),这与由 7 亮氨酸重复序列介导的亮氨酸拉链蛋白在形成二聚体时相似(Landschulz et al. 1988; Turner & Tjian 1989)。然而,最近的生物化学分析驳斥了这一观点,在 β 亚基内用丙氨酸代替 Ile-90 和 Leu-97 并不影响其与 α 亚基间的作用(M. Gryka et al. 未发表)。

DNA 与蛋白质相互作用

在特定位点上用 BrdU 取代的寡聚核苷链(3'端含有两个 T₄G₄ 重复序列)重建三聚体复合物,用 UV 交联可确定 α 亚基中的三个氨基酸残基与 DNA 紧密接触(见图 4-2): Tyr-142 与取代的 T15 交联、Tyr-239 与取代的 G3 交联、His-292 与取代的 T7 交联(核苷酸的记数从 3'端算起)(Hicke et al. 1994)。这三个残基都位于与 DNA 结合的结构域内(Fang et al. 1993)。Tyr-142 和 His-292 位于结构域中最疏水区域内,表明 α 亚基可能通过芳香氨基酸与端粒 DNA 结合,进入到核苷酸堆积碱基中(Hicke et al. 1994)。这样的观察结果也见于基于 NMR 研究的其他 DNA·蛋白质复合物,被认为是序列非特异性单链 DNA 结合蛋白质的一般特征(O'Connor & Coleman 1983; Prigodich et al. 1984)。疏水作用可以解释复合物的盐稳定性(Gottschling & Zakian 1986)。第三个交联残基, Tyr-239,位于 α 亚基的亲水/酸性区。

通过对来自尖毛虫、棘尾虫(Fang & Cech 1991)和游仆虫(Wang et al. 1992)的 α 亚基进行的序列分析,人们发现所有的三种交联残基都很保守,说明这些蛋白质与 DNA 发生相似的反应,尽管在尖毛虫和游仆虫的蛋白质之间存在很大的进化差异(约 35%的氨基酸一致)。

β 亚基的 DNA 伴侣活性

在体外生理条件下,β 亚基能够以分子伴侣的形式,通过端粒 DNA 促进 G 四集体的形成(见图 4-3)(Fang & Cech 1993b,1993c)。反应产物是端粒 DNA 的二聚体和四聚体。在尖毛虫($T_4G_4T_4G_4$)和四膜虫($T_2G_4T_2G_4$)的端粒序列中,反应发生在寡聚核苷酸的末端。β 亚基不能促进新的反应;寡核苷酸自身能形成 G 四集体,这是 β 介导反应所必需的前提条件,而且 β 亚基可以提高有利于热动力学反应方向的反应速度。DNA 的浓度为 20nmol/L 时,速度的增加幅度为 $10^5 \sim 10^6$ 倍。当蛋白质浓度较低时,β 亚基可以促进 G 四集体的形成,但不能保证与 DNA 的稳定结合,这种情况下它可能起催化剂的作用。在有助于蛋白质·DNA 复合物形成的高浓度蛋白质条件下,用蛋白酶 K 处理后发现,形成了相同的 DNA 结构。蛋白质缺失分析表明,羧基末端高度碱性区(见图 4-2)是 β 介导的反应必要且充分的条件。因此,β 亚基需要两个不同的结构域来促进 G 四集体和三聚体复合物的形成,这代表了 β 亚基两个独立的活性。

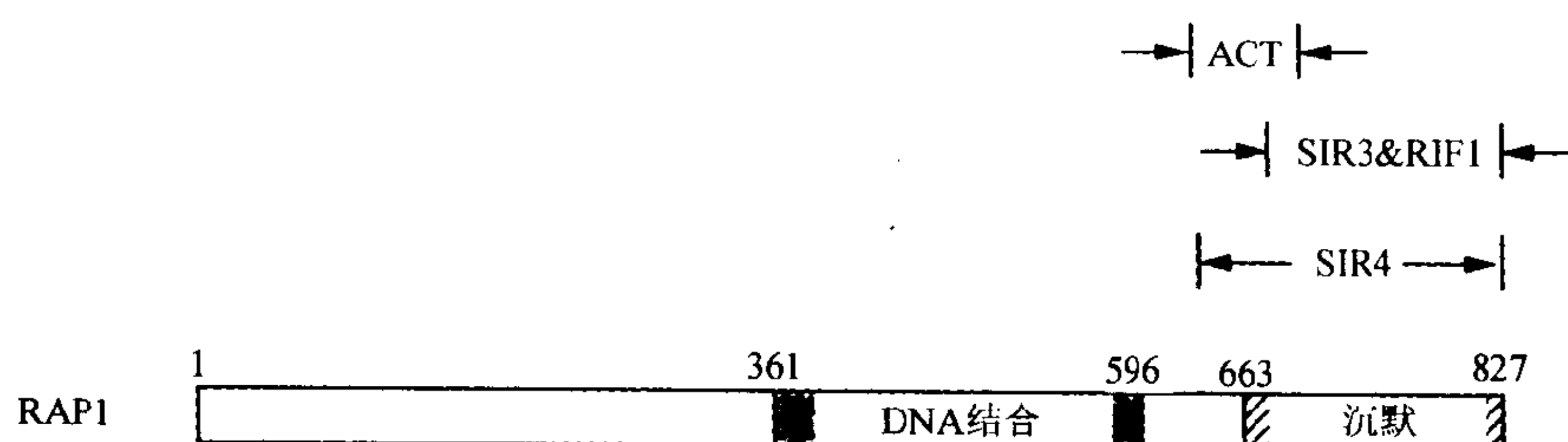


图 4-3 RAP1 的结构域

SIR4 相互作用区(氨基酸 635~827)、SIR3 和 RIF1 相互作用区(氨基酸 679~827)(Moretti et al. 1994)、转录活化结构域(ACT,氨基酸 630~695)(Hardy et al. 1992a)。生物化学研究表明,SIR3 与 RAP1 在体外能够结合(Moretti et al. 1994)。*rap1⁻* 的基因产物不能与野生型 RIF1 发生反应,突变的 *rif1* 等位基因产物可以恢复在酵母双杂交的系统(yeast two-hybrid system)中 RAP1⁺ 和 RIF1 的相互反应(Hardy et al. 1992b),这表明在 RAP1 和 RIF1 间有直接的物理作用。尽管在酵母双杂交的系统内 RAP1 可与 SIR4 相互作用,但我们还不清楚这种相互作用是由这两种蛋白的直接接触所引起的,还是由其他未知的蛋白所介导的。

这种 DNA 伴侣活性在体内可能有什么功能呢?β 亚基可能会在巨核发育的特定阶段调节端粒与端粒的连接,这个时期可能是合成新的端粒时期或快速生长细胞中的细胞分裂的 S 期(Fang & Cech 1993b)。它也有可能促进逆向反应,使 G 四集体结构解折叠。被解开的端粒 DNA 可以被其他端粒因子获得并保存,如 α·β 异源二聚体(heterodimer)或端粒酶。由于分子内折叠的 DNA 不能作为端粒酶延长端粒的引物(Zahler et al. 1991),而且端粒蛋白与折叠的 G 四集体结构也不形成一个稳定的 α·β·DNA 复合物(Raghuraman & Cech 1990),所以通过 β 亚基解开 DNA 结构中的折叠可能对端粒功能的正确发挥起重要作用。

核酸具有动力学结构。正确结构的形成可能会被高活化能屏障或其他结构的竞争所阻断。所以,在分子活动的不同阶段,功能性结构的形成或在两种可变构象间的转换可能还需要一种蛋白质促进分子,这与一些蛋白质折叠需要伴侣分子相似。β 亚基明显可以起到 DNA 分子伴侣的作用,在体外加速 G 四集体的形成。蛋白质伴侣有利于特殊的 DNA

结构,这种观点可以应用到其他一些过程中。例如,有人认为伴侣活性可以在不利于热力学的分子构型中(如弯曲、扭转等)稳定 DNA,以此提高大的核蛋白复合物的装配速度,如核小体(Travers et al. 1994)。DNA 伴侣分子可能在 DNA 装配中起着广泛的作用。

端粒蛋白质的磷酸化

用放射性磷酸和 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 分别标记尖毛虫体内和分离核中的 α 和 β 亚基(Hicke 1993), β 亚基的磷酸化程度要比 α 亚基大。对体外磷酸化 β 亚基的蛋白水解片段分析发现,磷酸化发生在 223 与 345 氨基酸之间。这个区域与组蛋白 H1 序列稍有些相似,含有两个位点(283T-P-S-K 286、292T-P-Q-K 295)(见图 4-2),适合作 $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ 磷酸化的共有底物序列(S/T-P-X-Z,这里 X 为极性氨基酸,Z 为碱性氨基酸)(Moreno & Nurse 1990)。

在体外, β 亚基可以在鼠细胞纯化的 $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ 同系物作用下充分磷酸化(Hicke et al. 1995)。由于尚不能进行新种尖毛虫同步培养,细胞周期的磷酸化调节实验在同步的非洲蟾蜍卵提取物中进行。游离的或三聚体中的 β 亚基在 M 期被磷酸化,在间期脱磷酸化,在下一个 M 期又被磷酸化。现认为 β 亚基羧基末端通过 $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ 同系物磷酸化可能参与高级端粒结构的调节或者 β 亚基促进 G 四集体形成的能力的调节。

端粒蛋白和端粒酶的亚核定位

通过间接免疫荧光抗体染色(用兔抗 α 、 β 血清和抗 DNA 单克隆抗体)测定出尖毛虫端粒蛋白与巨核 DNA 分散在整个巨核中(Fang & Cech 1995)。但是这种分布并不均匀,巨核中有很多球形的位点中既不含有 DNA 也不含端粒蛋白质。Pairwise 双染色(pairwise double staining)表明, α 、 β 和 DNA 共同位于巨核之中。在 S 期,巨核 DNA 复制机制组织成被称为“DNA 复制带”的碟形结构(Prescott 1994)。在尖毛虫中,这个带起始于巨核的 DNA 末端一点上,并向另一端移动,同时复制 DNA。处于 S 期的巨核,端粒蛋白在 DNA 复制带处的染色比其他部位深(Fang & Cech 1995)。DNA 复制带中的端粒蛋白可能向新合成的端粒 DNA 起加帽作用,并保护其不被降解。

令人感到惊讶的是,端粒酶 RNA 在核内的分布明显不同于端粒蛋白质的分布(Fang & Cech 1995)。将与尖毛虫端粒酶 RNA 模板区互补并用生物素标记的寡核苷酸用于荧光原位杂交实验时,端粒酶 RNA 可见于 S 期和非复制期巨核中的球形位点中。这样说来,大部分的端粒酶 RNA 都分布在核内,不参与细胞周期的调节。由于还没有在这些位点中发现端粒 DNA,那么这些位点也不可能是端粒酶的活性位点。这些位点含有 rRNA 和小核 RNA(G. Fang & T. R. Cech 未发表),并具有很多功能,如成熟、组装和端粒酶或其他核蛋白分子的存贮等。在处于 S 期的细胞核中,端粒酶 RNA 除了位于上述位点以外,还见于 DNA 复制带中。有趣的是,在一部分处于 S 期的细胞核中,发现端粒酶处于 DNA 复制带中,以带的移动方向为准,它位于端粒蛋白之前,这表明端粒酶的进入发生在 DNA 复制之前。

与核基质的连接

在新种尖毛虫中,大部分巨核 DNA 和端粒蛋白是从用二碘水杨酸锂(lithium-diiodosalicylate)溶液处理后的巨核中提取出来的(G. Fang & T. R. Cech 未发表)。将所得的

核基质溶于 SDS 中,并用凝胶电泳分离基质蛋白,然后转移到硝酸纤维膜上,在膜上复性,用放射性端粒复合物($\alpha \cdot \beta \cdot \text{DNA}$)作探针检测,结果发现有大量约 60kDa 的蛋白质(每个巨核细胞中约有 50 万拷贝)与端粒复合物发生反应。这种 60kDa 蛋白与端粒 DNA 寡聚核苷酸单独不发生反应。很有可能,尖毛虫端粒的一部分片段通过与 60kDa 蛋白作用与一些核结构发生连接,这种连接在提取时受到了破坏(Gasser et al. 1989)。

端粒复合物与端粒酶的相互作用

在巨核细胞提取物中,与端粒蛋白结合的端粒 DNA 寡聚核苷酸可以用来作为端粒酶延长作用的底物,但与未结合的 DNA 相比效率低约 5 倍(Shippen et al. 1994)。在富含 C 的互补链存在的情况下,端粒 DNA 还可以用 AMV 反转录酶和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段进行延伸。然而,与蛋白质结合的端粒 DNA 不能用末端转移酶标记,这说明端粒 DNA 与蛋白质不能有效地解离,所以不能与末端转移酶发生反应。这一结果表明,尽管端粒 DNA 的骨架受到蛋白质的保护,可以免受核酶的降解与 $\text{Fe(II)} \cdot \text{EDTA}$ 的切除(Gottschling & Cech 1984; Gottschling & Zakian 1986; G. Fang & T. R. Cech 未发表),但末端的碱基对至少部分地暴露出来,末端 3' 羟基是可以接触到的。虽然可能会发生端粒复合物与端粒酶间或端粒复合物与 C 链间(以模板的形式加入到反转录酶和 DNA 聚合酶实验之中)(Shippen et al. 1994) 的相互作用而使复合物的构象变化,但是对于端粒酶的延长作用或 DNA 聚合酶或反转录酶的延长来说,不一定必须要求端粒蛋白完全脱离 DNA。

棘尾虫端粒蛋白质

来自另一下毛亚目纤毛虫——贻贝棘尾虫(*Stylonychia mytilus*) 编码假定端粒蛋白质的基因,基于与尖毛虫该基因的同源性现已经被克隆出来(Fang & Cech 1991)。经过对其产生的多肽分子质量进行计算,认为与棘尾虫的两个主要的巨核蛋白质分子质量一致。其中一个在 DNA-蛋白质印迹(south-western blot)分析中证明可以与单链端粒 DNA 结合(Steinhilber & Lipps 1986)。贻贝棘尾虫基因编码的氨基酸序列有 79% 与尖毛虫的 α 亚基相同,77% 与尖毛虫 β 亚基相同。棘尾虫 α 亚基的一个 360 个氨基酸的结构域(与 DNA 结合区和亚基相互作用区有一定的重叠)与人中间丝蛋白波形纤维蛋白有弱的相似性(17% 同源性和 19% 的相似性)(Fang & Cech 1991; Fang 1993; Fang et al. 1993)。尽管波形纤维蛋白和核纤层蛋白被证明能够与端粒 DNA 在体外结合(Shoeman et al. 1988; Shoeman & Traub 1990),但仍需要用进一步的实验去证实,以确定端粒蛋白和中间丝蛋白间是否存在着结构与功能上的相关性。

游仆虫端粒蛋白

α 和 α 同系物

初步分析认为,厚游仆虫端粒中的核蛋白质复合物看起来与新种尖毛虫的非常相似(Price 1990)。这种复合物保护巨核 DNA 末端的 85~130bp 免受微球菌核酸酶的消化。每个末端 30~120bp 区域中的 DNA 位于复合物的表面。在最末端处,可观察到与尖毛虫

中相似的盐稳定的 DNA 和蛋白质间的相互作用在最末端的地方,与在尖毛虫中观察到的相似,然而,用生物化学方法只分离出一条多肽链。游仆虫这种 51kDa 的蛋白质有自身的甲基化保护模式与在分离核端粒中观察到的相似。现还没有关于与厚游仆虫端粒紧密结合的 β 亚基的证据(C. M. Price 个人通讯)。

生物化学重建研究(Price et al. 1992)表明,这个 51kDa 的蛋白质与单链 $(T_4G_4)_{\geq 3}T_4G_2$ 末端 3' 区发生特异性的结合,这个序列与游仆虫巨核 DNA 序列的天然末端相似。蛋白酶解分析表明,DNA 结合活性位于氨基末端 35kDa 结构域,它具有与完整蛋白质相同的 DNA 结合特异性。这种 DNA 序列结合的特异性和游仆虫蛋白质结构域的结构说明它和尖毛虫 α 亚基是同源物。但是它与尖毛虫 α 亚基的 DNA 结合结构域不同(Fang et al. 1993),也与完整游仆虫蛋白质不同。游仆虫蛋白质的 DNA 结合结构域不识别端粒 DNA 的 3' 末端。因此,这种蛋白质的羧基末端在一定程度上改变了 35kDa 结构域的 DNA 序列结合特异性。

游仆虫 α 亚基的两个基因已经被克隆(Wang et al. 1992)。其中一个编码 51kDa 端粒蛋白质的基因已被生化鉴定。另一个可能是编码端粒蛋白的一个 53kDa 同源物的基因,与 51kDa 蛋白质的氨基酸有 35% 的相同。在氨基酸水平上,棘尾虫和游仆虫 α 亚基间或尖毛虫和游仆虫 α 亚基间具有同样的一致性。在这 4 种蛋白质中,最为保守的区域是位于蛋白质氨基端 2/3 段内的几个氨基酸片段,蛋白质这一区域负责与 DNA 结合。DNA 结合区与尖毛虫蛋白质二聚体结构域的连接部位是表现出很大序列差异性区域之一。我们已经注意到(Wang et al. 1992; Hicke et al. 1994),有不等数量完全保守的残基为芳香族氨基酸 F、W 和 Y(86 个残基中有 23 个,占 27%)、疏水脂肪族氨基酸 L、I 和 V(19,占 22%)、带有正电荷的氨基酸 K 和 R(14,占 16%)、带有负电荷的氨基酸 D 和 E(11,占 13%),这表明疏水和带电离子残基在端粒蛋白质的结构与功能上具有重要的作用。53kDa α 同源物在厚游仆虫中的功能是什么呢? 通过与其他三种 α 多肽序列的比较可以看出,这种同源物能够与端粒 DNA 结合,虽然这种结合能力还有待于测定。 α 同源物的转录物只在巨核发育晚期、营养丰富、生长旺盛的细胞中才会检测到(DNA 复制的后几个循环)(W. Wang & C. M. Price 个人通讯)。在营养细胞中,间接免疫荧光染色证明,在此类细胞中,53kDa 的 α 同源物位于 DNA 复制带内。相反,在非复制期的细胞内,51kDa 端粒蛋白质遍及整个巨核。在 S 期细胞内 51 kDa 端粒蛋白在大多数 DNA 复制带内不能看到,只能在 DNA 复制带的后部边缘才能见到这一蛋白质的染色比巨核细胞的其他部分更加明亮(C. M. Price 个人通讯)。这些观察结果表明,同源物蛋白质在 DNA 复制期可能起一定作用,如精确调节端粒重复序列的数量或与端粒酶的相互作用等,而端粒蛋白可能结合并保护 DNA 复制带中新产生的端粒。51kDa 端粒蛋白还对非复制状态下的端粒提供加帽和保护功能。如果情况确实如此,这些不同的功能可能是由尖毛虫体内的单一端粒蛋白来完成,因为尖毛虫蛋白质(包括 α 和 β 亚基)不仅仅位于整个 DNA 的复制带内,还位于整个核内(Fang & Cech 1995)。现在已经有人利用位于阔口游仆虫(*E. eurystomus*)端粒蛋白末端合成的 14 氨基酸肽的抗血清对阔口游仆虫进行了细胞学分析(Olins et al. 1993)。然而,蛋白质的这些区域在非变性的条件下是无法接近的。

尽管可以说新种尖毛虫和厚游仆虫端粒大体上有着相似的结构,但是蛋白质组分、DNA 与蛋白质相互作用的具体反应和每一个多肽的功能都存在着很大的差别。很有可能

不同真核细胞的端粒核蛋白复合物具有相似的功能,但蛋白质组分的结构可能会有很大的不同,每一种都适应于自己的 DNA 序列。

发育调节

下毛亚目纤毛虫,如尖毛虫和游仆虫,在一个细胞中有两类细胞核。微核为种系核,含有通常大小的染色体,而巨核与体细胞核相同,有数百万基因大小的 DNA 分子(Klobutcher & Prescott 1986; Prescott 1994)。两个细胞接合后微核发育成巨核。在接合过程中,微核经历了减数分裂和有丝分裂(合子前分裂)。单倍体微核在两细胞间交换并发生融合,融合后二倍体微核进行有丝分裂(合子后分裂)。新形成的巨核是由其中一个有丝分裂产物发育而来。在这一过程中,微核染色体首先扩增,形成多线染色体,每个染色体中含有 32~64 个 DNA 拷贝。消除非巨核 DNA 序列以后,切割多线染色体产生基因大小的 DNA 分子,端粒序列就被加到每一 DNA 序列的两端。然后这些基因大小的 DNA 分子不经细胞分裂而自行复制几次。

在厚游仆虫中,端粒在开始合成时要比成熟时长 50bp,在巨核发育的后期被切除(Roth & Prescott 1985)。过长的端粒 DNA 在长度上很不一致,平均为 89~95bp(Vermeesch et al. 1993; Vermeesch & Price 1994),与成熟巨核内的端粒 DNA 相似,富含 G 的链突出于富含 C 的链。然而这种单链悬突在其 3' 核苷(G 或 T)和长度(9~14 个核苷,平均为 10 个核苷)的一致性上是有很大差别的。在巨核发育的特定时间内,切去端粒过长的部分不是因为 DNA 末端的不完全复制而引起,而是因为抑制 DNA 复制没有阻止切除。

厚游仆虫中编码端粒蛋白质的 mRNA 水平在配子接合过程中升降两次,与合子前和合子后微核分裂的阶段相一致(Price et al. 1994)。假设端粒蛋白质是由这种转录物合成,那么它在微核中也有一定的作用。在配子接合以后,端粒蛋白质转录水平会在端粒加入后再次升高,表明过长的端粒可能被新合成的端粒蛋白质结合。关于这种模型的一个未解问题是,过长端粒 DNA 的 3' 端单链悬突是以序列 G_1 、 G_2 、 T_2 或 T_3 结尾的(Vermeesch & Price 1994),而结合端粒蛋白质的最佳要求是 DNA 3' 端有 T_4G_2 序列。加入端粒后,转录水平降低 50%,并且在以后的巨核发育过程中一直保持在这一水平上,尽管在这个过程中,巨核细胞发育经历了 5 个 DNA 复制循环。编码 53kDa 的 α 同源物的转录物直到巨核发育的后期(已经有端粒的加入和切除)才发生积累(C. M. Price 个人通讯)。

具有单链端粒 DNA 结合活性的其他蛋白质

来自下毛亚目纤毛虫的端粒蛋白质,已充分鉴定是特异地与单链端粒 DNA 结合的蛋白质,它能够保护染色体末端免受核酶的降解。已知端粒序列和功能具有良好的进化保守性,那么我们就可以预计,整个端粒结构也具有保守性。在体外实验中,有一种非洲爪蟾的端粒蛋白质可以特异性地与脊椎动物富含 G 链的单链重复序列结合。这种蛋白质不与内部的或 5' 末端伸出的或在双链 DNA 中的 TTAGGG 重复序列结合,也不能与 r(UUAGGG)重复序列结合(Cardenas et al. 1993),因而这种蛋白质能够识别端粒悬突的 3' 末端。从 DNA 序列的要求和 DNA 蛋白质相互作用时的盐稳定性上,非洲爪蟾的端粒蛋白质具有尖毛虫端粒结合蛋白的特点。负责结合的蛋白质现在还没有被提纯出来,而

且它的端粒位置还有待于进一步测定。然而,越来越多的证据表明,末端特异性的端粒蛋白质在进化中可能是保守的。

在莱哈衣滴虫(*Chlamydomonas reinhardtii*)中,现已鉴定出来能与 G 链结合的 34kDa 的蛋白质(G-strand-binding protein,GBP)(Petracek et al. 1994)。GBP 特异地与其端粒序列 TTTTAGGG 结合,但不能与同一序列的 RNA 或双链端粒 DNA 结合。该蛋白质含有两个结构域,它们与 RNA 识别基序(RNA recognition motif,RRM)有同源性,其中一个区域富含甘氨酸、丙氨酸和精氨酸。阐明 GBP 的生物学功能还有待于进一步的研究。

已经证明核内异质的核糖核蛋白质(hnRNP)A1、A2/B1、D 和 E 可以在体外与单链 d(TTAGGG)_n 特异结合。然而这种蛋白质对 r(UUAGGG)_n 比对 d(TTAGGG)_n 有更高的亲合性(McKay & Cooke 1992a,1992b; Ishikawa et al. 1993)。这些 hnRNP 在端粒中是否发挥功能,尚有待于进一步证明。

中间丝蛋白的波形纤维蛋白和核纤层蛋白 A 和 C,现已经被证明具有单链 DNA 结合特性(Shoeman et al. 1988; Shoeman & Traub 1990)。在低离子强度下,波形纤维蛋白特别易于和寡聚 G 和多聚 G 结合,而核纤层蛋白的 A 和 C 易于和含 G 或 C 的单链 DNA 结合。波形纤维蛋白和核纤层蛋白 A 和 C 都能与含有人端粒重复序列寡核苷酸结合 ($K_d \approx 0.1 \sim 1 \mu\text{mol/L}$),具有中等的亲合力。波形纤维蛋白氨基末端非 α 螺旋区与结合有关系,这些反应在端粒功能中是否有意义还不清楚。

G 链结构特异结合活性

富含 G 的单链端粒 DNA 能够形成折叠的 G 四集体结构(Henderson 本书)。现已发现能够与 G 四集体结构特异结合的分子,例如,在四膜虫中大量的 TGP 因子(四膜虫 G4-结合蛋白质)与平行四链 G 四集体结合,但不与分子内 G 四集体结合(Schierer & Henderson 1994)。结合要求在四集体结构附近有单链区。现已测出鸟类细胞的因子 MF3 (肌肉因子 3)可以与单链富含 G 序列(包括端粒 DNA)结合(Gualberto et al. 1992)。化学修饰与核苷替代实验的结果是一致的,但不能证明结合的 DNA 存在于被分子内 G-G 碱基配对稳定的发夹样结构中。当然,现在与 G 链结构结合有关的蛋白质因子仍然不清楚,对它们在体内的生物学功能也不了解。

人们在体外已经对 G 四集体结构进行了深入的研究。然而,在非生理条件下,端粒 DNA 形成分子间 G 四集体结构需要很高的 DNA 浓度和很长的孵化时间。另一方面,一旦形成 G 四集体,它就会具有很大的动力学稳定性(Smith & Feigon 1992; Wang & Patel 1992)。如果这样的结构不进行去稳定或在端粒功能的某一阶段除去,端粒因子就不能与 G 四集体结构发生反应(Raghuraman & Cech 1990; Zahler et al. 1991)。最近的研究揭示,细胞因子能够调节 G 四集体结构的形成与破坏。如上所述,尖毛虫端粒蛋白能够促进,甚至可以催化 G 四集体结构的形成(Fang & Cech 1993b,1993c)。酵母 RAP1 蛋白质能与 G 四集体结构结合,并促其形成(Giraldo & Rhodes 1994)。在酿酒酵母中,核酶 KEM1 可使单链 DNA 5'端形成四链 G 四集体结构(Liu et al. 1993; Liu & Gilbert 1994)。这些发现充分地支持了 G 四集体结构的生物学相关性。

双链端粒 DNA 结合蛋白质

RAP1

抑制/活化蛋白质 1(repressor/activator protein, RAP1)(Shore & Nasmyth 1987)也叫上游翻译因子(translation upstream factor, TIF)(Huet et al. 1985)、端粒结合活性(Telomere-binding activity, TBA)(Berman et al. 1986)、SBF-E(Shore et al. 1987)和一般调节因子 1(general regulator factor1, GRF1)(Buchman et al. 1988a, 1988b)。它是酿酒酵母中重要的多功能序列特异性的 DNA 结合蛋白质。RAP1 能与双链酵母端粒 DNA 结合(Berman et al. 1986; Buchman et al. 1988a, 1988b; Longtine et al. 1989),参与调节端粒的长度(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990; Sussel & Shore 1991; Kyrion et al. 1992)。它还参与抑制端粒近端基因的表达,这种现象叫做端粒的位置效应(Kyrion et al. 1993; Zakian 本书; Shore 本书)。RAP1 可以作为转录的正或负的调节因子,可以激活接合型基因座 *MAT α* 的活性,也可以抑制 *HML* 和 *HMR* 的表达(Shore & Nasmyth 1987; Kurtz & Shore 1991; Giesman et al. 1991)。现已表明, RAP1 调节大量的参与控制细胞生长的酵母基因的表达。这些基因产物的功能体现在很多的复杂过程,如转录、翻译、糖酵解和营养转运(Capieaux et al. 1989)。另外, RAP1 还参与了环状质粒分离的过程(Kimmerly et al. 1988; Longtine et al. 1992)和减数分裂时重组的过程(White et al. 1991)。

有三个方面的证据表明, RAP1 在端粒中发挥作用。首先, RAP1 在体外与端粒 TG_{1~3} 序列结合(Berman et al. 1986; Buchman et al. 1988a, 1988b; Longtine et al. 1989)。DNA 酶 I 与化学足迹实验研究及条带迁移分析表明, RAP1 结合位点是端粒 DNA 上常见位点,每隔 18bp 发生一次结合(Gilson et al. 1993)。

第二, RAP1 与端粒 DNA 在体内相联。用微球菌核酸酶、DNA 酶 I 或限制酶消化染色体释放出的端体含有 RAP1 蛋白质(Conrad et al. 1990; Wright et al. 1992)。免疫定位表明, RAP1 位于配对的双价减数分裂染色体的末端(Klein et al. 1992; Dernburt et al. 本书)。RAP1 在酵母中含量丰富。每个单倍体细胞中有 4000~6000 个分子的 RAP1(Buchman et al. 1988a, 1988b; Verdier et al. 1990)。最少有 600 个分子(每个单倍体的酵母细胞中约有 10%~15% 的 RAP1 分子)与端粒 DNA 连接(Gilson et al. 1993)。

第三, RAP1 在体内影响端粒的长度和端粒的位置效应(Zakian 本书; Shore 本书)。

结构域的结构

RAP1 富含天门冬酰胺,为酸性蛋白质。它含有 827 个氨基酸,分子质量为 92 500Da(Shore & Nasmyth 1987)。然而,通过 SDS-PAGE 测定,发现它的分子质量约为 120 000 Da(Shore & Nasmyth 1987; Buchman et al. 1988b)。这种差别不可能是由于蛋白质转录后修饰引起的,因为大肠杆菌内表达的 RAP1 重组蛋白质具有同样的分子质量。

序列分析表明, RAP1 与 ABF1(ARS 结合因子 1)有较弱而广泛的序列同源性,尽管

也有人对这种明显的序列相似性提出了疑问(Henikoff 1991)。ABF1 是一种参与 DNA 复制、转录的激活与转录沉默的主要酵母蛋白质(Diffley & Stillman 1989a)。

RAP1 蛋白质的 DNA 结合区首先是由蛋白质限制性水解确定出来的(Huet & Sentenac 1987; Longtine et al. 1989)。从原生质体中制备 RAP1, 通过多克隆抗 RAP1 抗体检测发现一个 30kDa 的蛋白质水解片段(Longtine et al. 1989)。这一片段与端粒 DNA 上的 RAP1 结合位点结合, 且具有与完整 RAP1 相同的亲合力和 DNA 酶 I 足迹。因此, 这个 30kDa 区域与 DNA 结合有关。

大量缺失分析进一步确认了 RAP1 蛋白质的 DNA 结合区(见图 4-3)。Henry 等人(1990)发现, RAP1 的一种内部片段是它与不同的 RAP1 结合位点充分结合所必需的, 而且足以满足这种结合的需求。最小的 DNA 结合的结构域为 361 残基到 596 残基, 长度为 235 个氨基酸。序列分析没能揭示任何可识别的 DNA 结合基序, 如螺旋-转折-螺旋、锌指或亮氨酸拉链等。RAP1 的 DNA 结合区域与其他了解透彻的双链 DNA 结合蛋白, [如 GAL4(Keegan et al. 1986)和 GCN4(Hope & Struhl 1986)等]相比, 是比较大的。另外, 很少见到 RAP1 的 DNA 结合区域位于中心的位置。

通过 *rap1⁺* 突变体研究, 证实了用缺失分析的方法获得的 RAP1 DNA 结构域的基因图谱(Kurtz & Shore 1991)。温度敏感突变体(*rap1^s* 等位基因)在 DNA 结合区或其附近有氨基酸的改变(E367K、A458T、A563P 和 P694L), 在体外非允许的温度下失去结合 DNA 的活性。尽管 694 氨基酸位于 DNA 结合区域以外(已被缺失分析证明), 但是可以想像, 这一残基可能通过改变蛋白质的结构间接影响其 DNA 结合能力。这些突变体的表型也与它们在 DNA 结合上的缺陷是一致的。在半允许温度下, 所有变异株内的端粒长度变短, 增长速度下降(Lustig et al. 1990)。另外, 这些株表现出 *MAT α* 表达缺陷, 而它的上游活化序列含有 RAP1 结合位点(Kurtz & Shore 1991)。

尽管人们对于 RAP1 DNA 结合域以前的氨基末端区的功能了解甚少, 但其羧基末端区却可能具有很多的生物学活性。羧基末端区(G726E、D727A 和 R747S)的变异(*rap1⁺* 等位基因)引起端粒 DNA 的延长和沉默的 *HMR* 基因座去阻遏(Sussel & Shore 1991)。令人奇怪的是, 这些突变体在生长速度上没有明显的缺陷, 表明大量 RAP1 调节基因的产物表达没受到明显的影响。这一结果说明, RAP1 在转录沉默和端粒长度调节上的作用至少是部分相关的, 而与其在转录激活上的主要功能无关, 是相互独立的。与这一结论相一致, RAP1 蛋白质羧基末端(介于 663 和 684 氨基酸之间)(*rap1⁺* 等位基因)切除后, 可以同时使端粒不再沉默并增加端粒的长度(Kyrion et al. 1992, 1993)。这样, RAP1 羧基末端的 1/5 肽段对于转录沉默来说非常重要(见图 4-3)。这一区域的过度表达会引起端粒的延长, 并使沉默的 *HMR* 基因座表达(Conrad et al. 1990; Hardy et al. 1992a), 说明这一区域与一种可滴定的沉默因子间有相互作用。几种因子如 SIR3、SIR4(SIR 为沉默信息调节子)和 RIF1(RIF 为 RAP1 相互作用因子), 已经在酵母双杂交(two-hybrid)系统中通过它们与 RAP1 羧基末端区的反应分离出来(见图 4-3)。遗传学研究表明, 他们均参与转录沉默和端粒长度的调节(Rine & Herskowitz 1987; Aparicio et al. 1991; Hardy et al. 1992b; Kyrion et al. 1993; Moretti et al. 1994)。

DNA 的结合

RAP1 与 DNA 序列结合,这种现象可见于端粒、沉默子和很多不同的上游激活序列(upstream activation sequence, UAS)。一个不对称的共有序列,5'-(A/G)(A/C)ACC-CANNCA(T/C)(T/C)-3'(其中 N 为任何一种核苷酸),就是通过比较这些不同靶部位的 RAP1 结合位点得出来的(Buchman et al. 1988b)。RAP1 在端粒上与序列 5'-ACAC-CCACACACC-3' 结合(Buchman et al. 1988a; Wang & Zakian 1990)。与双链 5'-ACAC-CCATACATT-3' 解离的常数为 $1.3 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ 。将这一值与非特异性 DNA 的解离常数($8.7 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)比较可以看出,RAP1 与其靶序列具有很高的亲和性和很高的特异结合能力(Vignais et al. 1990)。

突变分析证明,在这个含 13 个核苷酸的共有序列上,2、3、4、5、6、7、10 和 12 位点上的碱基一致性非常重要,已经发现位置 5 上的中央 G·C 碱基对于 RAP1 结合具有关键的作用(Vignais & Sentenac 1989; Vignais et al. 1990)。在此基础上,利用体外选择和扩增技术,Graham 和 Chambers (1994)确定出 RAP1 共有的结合位点是 5'-(A/G)T(A/G)CACCCANNC(C/A)CC-3',与变异研究的结果相同。新生成的序列在 5' 端长出 2bp (称为位点-1和-2),而在 3' 端受到更大的限制。对选择序列的最终结果进行分析表明,CACCC 为核心序列,特别是 C₃ 片段内的第一和第二个 C 对 RAP1 的识别甚为重要。然而一个带有 4 个错配碱基和一个缺口的序列可以被 RAP1 识别出来,表明 RAP1 具有很广泛的序列特异性。非常有趣的是,观察到的这种很强的负协同作用中,两个明显中性单一突变的组合具有一种很强的负效应(Vignais et al. 1990)。由此可知错配的位点和组合对于 RAP1 的结合都是非常重要的。

化学修饰与干扰实验表明,RAP1 结合在 DNA 的大沟上(Longtine et al. 1989; Vignais et al. 1990; Gilson et al. 1993)。另外,无论是 RAP1 还是它最小的 30kDa DNA 结合区域与 DNA 的结合,都会诱发高锰酸钾与端粒序列中 8、10 位点上的 C 残基(5'-ACACCCACACACC-3')发生反应(Gilson et al. 1993)。与此不同,对富含 C 的 DNA 链进行的 DMS 甲基化保护分析表明,RAP1 结合不会使处于位点 8 和 10 处的碱基对解链。很多化学修饰研究表明,RAP1 和 DNA 间存在两个接触位置:一个位于 4~6 核苷酸处,另一个位于 10~13 核苷酸处。蛋白质的结合扭曲了这两个区域间的 DNA,使得位点 8 和 10 处的核苷酸具有一些单链 DNA 的特性,即能够与高锰酸钾发生反应。

在体外将长的酵母端粒 DNA (270bp)与 RAP1 结合发现,很多 RAP1 分子能够同时发生结合(Gilson et al. 1993)。用高锰酸钾超反应检测结合位点,发现每 18bp 就有一个结合位点。长序列的 DNA(至 140bp)完全受到保护,不被 DNA 酶 I 切除。然而 RAP1 的占位模式看起来很复杂。两个 RAP1 分子可以同时与一个部分重叠的位点结合。许多同时含 2 个错配碱基的位点被结合,而有些完全正确的共有结合序列位点却没有被占据。

RAP1(而不是它最小的 30kDa 结合 DNA 的结构域)与 DNA 的结合,可在共有序列上游的一个位点诱发非对称性 DNA 弯曲(Vignais & Sentenac 1989; Gilson et al. 1993)。因此,DNA 结合(包括在 DNA 接合位点内的局部区域内发生的扭曲)和 DNA 弯曲是 RAP1 蛋白质两个独立的活性。DNA 弯曲要求 RAP1 在其 DNA 结合区域外的一个或几个区域。弯曲的程度与 RAP1 结合的亲和力无任何关系,这一点已被 DNA 序列突变

分析所证明。RAP1 诱发的 DNA 弯曲,与在端粒、接合型的沉默子和 UAS 序列上发现的三个不同位点都很相似。电子显微镜分析表明,弯曲的角度为 90° 到 100° (Gilson et al. 1993)。现在已经观察到,RAP1 的结合引起端粒 C 链中心识别位点外发生 DMS 超反应,RAP1 易于和它的识别位点的 5' 端 C 残基被胍修饰过的 DNA 发生结合 (Gilson et al. 1993)。这些观察结果与 DNA 弯曲是否有关,还需要对弯曲位置作仔细的图谱分析。还有报道说,在体外环境下,RAP1 可以在两个非相邻结合位点间介导环的形成 (Hofmann et al. 1989)。

间接的证据表明 RAP1 发生了磷酸化,这种修饰能够影响它的 DNA 结合能力。用磷酸酶处理 RAP1 或 30kDa DNA 结合区域会增加它们与 DNA (含有酵母磷酸甘油激酶基因启动子的 UAS) 的结合能力,但与含无关 5' 端侧翼序列的 DNA 结合力下降 (Tsang et al. 1990)。酵母 cAMP 依赖性蛋白激酶高水平的组成型表达,可通过 RAP1 增加转录的活化 (Klein & Struhl 1994)。端粒上 RAP1 磷酸化的程度和它对端粒功能的意义是非常有前景的,这里我们不做进一步的讨论。

促进 G 四集体形成

RAP1 与酵母端粒 DNA 富含 G 的单链所形成的折叠结构结合,比它与双链 DNA 上位点结合的亲和力要弱 (Giraldo & Rhodes 1994)。G 四集体可以稳定这些折叠的 DNA 结构,包括 G_3 片段上 N7 位的鸟嘌呤残基。有效的结合也依赖于 DNA 序列的长度与序列上的碱基,即至少要有 4 个 G_3 片段。最小的 30kDa DNA 结合区域不与折叠的 DNA 结构结合。那么,这一区域以外的一个或多个区域对于这种结合就显得很重要。这种结合是否因为 G 四集体结构上存在结构特异识别位点,或仅仅由于高浓度的负电荷存在,还有待于进一步测定。在 G 四集体不稳定的条件下(即低钾浓度、高温),RAP1 能够稳定 G 四集体结构,因而促进 G 四集体结构的形成 (Giraldo & Rhodes 1994)。所以,很有可能 RAP1 通过与折叠结构的结合,改变了 G 四集体形成的平衡。

在非变性的凝胶中,RAP1 可以促使两个明显移动速度不同的折叠 DNA 带的形成 (Giraldo & Rhodes 1994)。它们相对慢于未折叠 DNA 电泳移动速度,这说明:这些分子内部存在 G 四集体结构,尽管未测定出含的是 G 单链的二聚体或四聚体。那么,为什么 RAP1 与 DNA 的结合要求有 G_3 片段的四重复序列存在呢? 作者认为,这可能是因为 G_3 片段比起 G_4 片段来说结构稳定性比较低。RAP1 能否促进含有两个 G_4 片段的尖毛虫和四膜虫端粒 DNA 形成 G 四集体将是一个很有趣的问题。

在尖毛虫端粒蛋白质的 β 亚基和酵母 RAP1 蛋白间,我们发现了惊人的相似性。这两种蛋白质的功能均作用在端粒上,都能够在纳摩尔水平的 DNA 浓度 (nanomolar DNA concentration) 上促进 G 四集体的形成。然而,这两个反应间有着很大的不同。首先 β 亚基作为一种伴侣,可以促进结构的形成,但与 DNA 无序列特异性的结合,而 RAP1 则以序列特异地与双链 DNA 结合,而且还能够与 G 四集体稳定地结合。 β 亚基能够从动力学角度提高速度,而 RAP1 则从热动力学角度稳定反应的产物。第二, β 亚基羧基末端高碱性区与促进结构形成活性有关。尽管这一区域 RAP1 的作用还没有确定出来,但是序列分析证明,在 RAP1 中无长片段的碱性区。另外,尖毛虫端粒 DNA 至少可以形成 6 种不同的 G 四集体结构,而且 β 亚基可以不加区分地促进同类结构的形成。RAP1 蛋白质的这方

面问题有待于进一步的分析。只基于 DMS 甲基化保护方式,我们还不清楚 RAP1-DNA 复合物中的 G 四集体结构是否与那些在没有 RAP1 时形成的 G 四集体(来源于同一序列)相似,因为不同的 G 四集体可以产生同样的甲基化保护模式。

与核骨架的连接

核骨架是一种从适当的提取条件下获得的没有组蛋白的核结构,RAP1 可与核骨架连接 (Hofmann et al. 1989)。在核骨架组分中,RAP1 蛋白的含量超过 90%。RAP1 分子溶于核骨架的尿素提取液中,与 *HMR* 和 *HML* 上的沉默子结合。另外,溶解的 RAP1 介导一段带有 *HML* 基因座的 DNA 片段环化。

用抗 RAP1 抗体进行的薄层免疫电子显微镜和免疫荧光聚焦显微镜研究,发现处于间期的细胞核,其染色斑点主要出现在核周边部位(Klein et al. 1992; Palladino et al. 1993; Dernburg et al. 本书)。这种染色模式是由于端粒结合 RAP1 的原因,因为在 *est 1* 株中(端粒 DNA 的长度每代都有缩短的现象)(Lundblad & Szostak 1989),染成亮色的 RAP1 位点会在长期的生长中进行性地丢失(Palladino et al. 1993)。端粒在野生型细胞中成簇存在。野生型双倍体细胞中的 RAP1 位点数量(平均每个细胞有 7~8 个),如果不用变性剂提取,要少于端粒的数量。然而在存在 Triton X-100 和 SDS 时,RAP1 荧光点的数量就可以增加到端粒的数量。

RAP1 可以与 SIR4 相互作用(Moretti et al. 1994)。现在已经观察到 SIR4 蛋白质的羧基末端与人核纤层蛋白 A 和 C 中心棒状区域具有弱的序列相似性,并可能通过螺旋相互作用方式与核骨架发生连接(Diffley & Stillman 1989b)。如果在体内确实发生这种相互作用,那么我们就可以预测,RAP1 蛋白质通过 SIR4 介导的相互作用附着在核骨架上,于是也把端粒附着在核骨架上。观察其他生物的细胞时发现,染色体末端位于核的外周,并附着于核骨架上(Dernburg et al. 本书)。在人的细胞(de Lange 1992)和尖毛虫(见上文)内,也有生物化学证据表明端粒与核基质可发生连接。

和 SIR4 相似,SIR3 蛋白质也与 RAP1 相互作用(Shore 本书)。然而,*SIR3* 和 *SIR4* 被破坏后 RAP1 仍能继续与核骨架连接(Hofmann et al. 1989)。这样,SIR3 与 SIR4 蛋白质并不是 RAP1 与核骨架连接的主要介导因子。

端粒中 RAP1 的功能

人们曾提出,RAP1 通过参与改变染色质结构的形成来调节端粒的长度和转录沉默(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990; Sussel & Shore 1991)。但有很多的现象,如抗微生物核酸酶端体的存在(Wright et al. 1992)、转录沉默时 *SIR* 基因和组蛋白 H4、H3 的高度保守氨基末端区的参与(Aparicio et al. 1991; Thompson et al. 1994)及体内端粒近端 DNA 不能甲基化(Gottschling 1992),都表明端粒被包装成一个可变的能起到保护作用的染色质结构中,这可以抑制附近基因的转录(Zakian 本书;Shore 本书)。

与尖毛虫端粒蛋白相似,RAP1 在端粒中的一个功能可能是与端粒 DNA 结合,保护它不缩短。这样,含有丧失功能的 RAP1 突变体(*rap 1^o*)的端粒比较短,RAP1 的过度表达会使端粒延长(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990)。在 *rap 1^o* 和 *rap 1⁺* 突变体上,有关

转录沉默的区域内出现的变异,能够部分地打开端粒染色质的结构,并增加端粒 DNA 对端粒酶的接近机会,导致端粒的增长(Sussel & Shore 1991; Kyrion et al. 1992)。RAP1 的变化,无论是由变异引起,还是由它改变细胞内表达水平的变化引起,都会导致 RAP1 和其作用的蛋白间相互作用的变化,进一步引起端粒染色质结构的变化。这种染色质结构的变化,接下来会使端粒 DNA 延长(与端粒酶反应)或缩短(与核酸酶反应)。端粒 DNA 的最终长度将依赖于这两种酶与端粒 DNA 的接近程度和这些反应竞争的程度(Conrad et al. 1990)。

其他因子

在酵母中很可能还有其他一些端粒蛋白质。端粒结合因子 TBF α 和 TBF β 与 RAP1 在色谱属性和 DNA 结合特异性上有着明显的不同。TBF β 只与双链 TG_{1~3} 重复序列结合。在体外克隆的酵母端粒中, TBF α 能与亚端粒 X 成分和 TG_{1~3} 重复序列间的连接部位结合,包括 T₂AG₃ 序列(Liu & Tye 1991)。TBF α 还与四膜虫(T₄G₄)及脊椎动物(T₂AG₃)的端粒重复序列结合。序列分析表明 T₂AG₃ 位于 X 元件和 TG_{1~3} 重复序列之间。来自于四膜虫和脊椎动物的端粒序列,甚至包括距线性质粒末端几百个碱基对的位点,都可以成为酵母中端粒延伸的引物(Murray et al. 1988)。TBF α 被认为可以作为锚定蛋白质,使其他端粒因子如端粒酶等,定位到远离末端的保守的连接序列,使异源端粒序列[如人端粒重复序列(T₂GA₃)]在酵母中发挥功能。

利用放射标记双链 T₂GA₃ 多聚物作为探针可从 cDNA 表达文库中分离出一种酵母基因 *TBF1* (Brigati et al. 1993)。按照其分子质量、蛋白质结合特异性和色谱特性, TBF1 (T₂GA₃ 重复结合因子 1) 和 TBF α 很可能是完全相同的。已经绘出 DNA 结合区域中羧基末端 250 个氨基酸的图谱,但没有确认出 DNA 结合的基序。序列分析表明, TBF1 的中间部位含有核苷酸结合的结构域。*TBF1* 是一个必需基因。然而,在半允许温度下长成的温度敏感变异株中端粒保持了野生型的长度。TBF1 在体内是否作用于端粒,还有待于进一步的研究。

Runge 和 Zakian(1989)通过把多拷贝的线性或环形质粒引入细胞中,发现细胞中端粒数量的增加,导致端粒 DNA 的长度也有所增加。增加的量与质粒的拷贝数目是成比例的。因此可能存在一种或多种限制性因子,直接或间接识别端粒 DNA,从而抑制端粒的延长。由于 RAP1 的过度表达会引起端粒的延长而不是缩短,因此, RAP1 不是这样的因子(Conrad et al. 1991)。是 TBF α 和 TBF β 或是其他未知的蛋白来发挥抑制作用仍有待证明。

已经从别的生物体内分离出来能与双链端粒 DNA 进行序列特异性结合的蛋白质。在绒泡菌属多头花序(*Physarum polycephalum*)中,已经纯化出 10kDa 的蛋白质(Coren et al. 1991; Coren & Vogt 1992)。这种蛋白质具有热稳定性,在体外能与多绒泡菌属(*Physarum*) T₂AG₃ 端粒重复序列特异地结合,人们认为它在体内可以包埋整个双链端粒 DNA。已经从人、小鼠和猴的核抽提物中得以确认出一个 50kDa 的哺乳动物 TTAGGG 重复序列因子(TRF),它可以与多个 T₂AG₃ 重复序列结合(Zhong et al. 1992)。这个因子能特异地与双链 T₂AG₃ 重复序列结合,而与单链重复序列不结合,且至

少需要 6 个连续的 T₂AG₃ 重复序列才能达到最佳的结合。这些蛋白质在体内的功能有待于进一步研究。

展望

在分子水平认识端粒蛋白质的结构与功能方面,在过去的几年间取得的进展是非常迅速的,同时又提出了很多新的问题。例如,G 四集体的生物学功能是什么?端粒因子,比如说端粒蛋白、端粒酶等是如何发挥功能的,在纤毛虫细胞周期和巨核发育中的不同阶段是如何协调它们的活性的?端粒蛋白质怎样与其他细胞因子发生作用?端粒在分子水平上是如何组织的?端粒的细胞定位有什么意义?更重要的是,对高等真核的端粒蛋白质需要作进一步的证明。端粒蛋白质可能在染色体维持、细胞分裂、保护染色体末端和调节端粒长度上起着广泛的作用。例如,RAP1 的过度表达或蛋白质羧基末端区的切除,都会加快染色体丢失的速度(Conrad et al. 1990;Kyrion et al. 1992)。在体内,通过使端粒 RNA 模板序列变异改变四膜虫端粒序列,会引起核与细胞分裂上的缺陷,导致衰老。这种表现型被认为是来自于弱化的端粒 DNA 与蛋白质间相互作用的结果(Yu et al. 1990)。现有可靠的数据来描述纤毛虫和酵母端粒蛋白质,这为我们在分子水平解决这些具有挑战性的问题,以及进一步理解端粒的结构和功能提供了良好的手段。

致谢

感谢 C. Price 和 S. Schultz 在论文发表之前同我们交流,感谢 J. Cooper 和 J. Linger 对我们的手稿提出的意见。研究是在国家卫生署 (GM-28039) 支持下进行的。T. R. C 和 G. F. 都是哈佛大学的研究员,T. R. C 也是美国癌症协会教授。

参考文献

- Allshire, R.C., J.R. Gosden, S.H. Cross, G. Cranston, D. Rout, N. Sugawara, J.W. Szostak, P.A. Fantes, and N.D. Hastie. 1988. Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. *Nature* **322**: 656-659.
- Aparicio, O., B. Billington, and D. Gottschling. 1991. Modifiers of position effects are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**: 1279-1288.
- Bandziulis, R.J., M.S. Swanson, and G. Dreyfuss. 1989. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* **3**: 431-435.
- Berman, J., C.Y. Tachibana, and B.-K. Tye. 1986. Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 3713-3717.
- Blackburn, E.H. and S.S. Chiou. 1981. Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 2263-2267.
- Blackburn, E.H. and J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal rRNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* **120**: 33-53.
- Brigati, C., S. Kurtz, D. Balderes, G. Vidali, and D. Shore. 1993. An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1306-1314.

- Buchman, A.R., N.F. Lue, and R.D. Kornberg. 1988a. Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5086-5099.
- Buchman, A.R., W.J. Kimmerly, J. Rine, and R.D. Kornberg. 1988b. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activation sequences, autonomous replication sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 210-255.
- Budarf, M.L. and E.H. Blackburn. 1986. Chromatin structure of the telomeric region and 3' non-transcribed spacer of *Tetrahymena* ribosomal RNA genes. *J. Biol. Chem.* 261: 363-369.
- Capieaux, E., M.L. Vignais, A. Sentenac, and A. Goffeau. 1989. The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* 264: 7437-7446.
- Cardenas, M.E., A. Bianchi, and T. de Lange. 1993. A *Xenopus* egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. *Genes Dev.* 7: 883-894.
- Cech, C.L. and W.R. McClure. 1980. Characterization of ribonucleic acid polymerase-T7 promoter binary complexes. *Biochemistry* 19: 2440-2447.
- Conrad, M.N., J.H. Wright, A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres *in vivo*: Overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 63: 739-750.
- Coren, J., E. Epstein, and V. Vogt. 1991. Characterization of a telomere-binding protein from *Physarum polycephalum*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2282-2290.
- Coren, J. and V. Vogt. 1992. Purification of a telomere-binding protein from *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1171: 162-166.
- de Lange, T. 1992. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J.* 11: 717-724.
- Diffley, J.F.X. and B. Stillman. 1989a. Similarity between the transcriptional silencer binding proteins ABF1 and RAP1. *Science* 246: 1034-1038.
- . 1989b. Transcriptional silencing and lamins. *Nature* 342: 24.
- Edwards, C.A. and R.A. Firtel. 1984. Site-specific phasing in the chromatin of the rDNA in *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 180: 73-90.
- Fang, G. 1993. "Structural and functional studies of *Oxytricha* telomere-binding protein." Ph.D. thesis. University of Colorado, Boulder.
- Fang, G. and T.R. Cech. 1991. Molecular cloning of telomere-binding protein genes from *Stylonychia mytilis*. *Nucleic Acids Res.* 19: 5515-5518.
- . 1993a. *Oxytricha* telomere-binding protein: DNA-dependent dimerization of the α and β subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6056-6060.
- . 1993b. The β subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* 74: 875-885.
- . 1993c. Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the β subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein. *Biochem.* 32: 11646-11657.
- . 1995. Telomerase RNA localized in the replication band and spherical sub-nuclear organelles in hypotrichous ciliates. *J. Cell Biol.* (in press).
- Fang, G., J.T. Gray, and T.R. Cech. 1993. *Oxytricha* telomere-binding protein: Separable DNA-binding and dimerization domains of the α subunit. *Genes Dev.* 7: 870-882.
- Gasser, S.M., B.B. Amati, M.E. Cardenas, and J.F.-X. Hofmann. 1989. Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int. Rev. Cytol.* 119: 57-96.
- Gellert, M., M.N. Lipsett, and D.R. Davies. 1962. Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48: 2013-2018.
- Giesman, D., L. Best, and K. Tatchell. 1991. The role of RAP1 in the regulation of the *MAT α* locus. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1069-1079.
- Gilson, E., M. Roberge, R. Giraldo, D. Rhodes, and S.M. Gasser. 1993. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J. Mol. Biol.* 231: 293-310.

- Giraldo, R. and D. Rhodes. 1994. The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA-quadruplexes in telomeric DNA. *EMBO J.* 13: 2411–2420.
- Gottschling, D.E. 1992. Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 4062–4065.
- Gottschling, D.E. and T.R. Cech. 1984. Chromatin structure of the molecular ends of *Oxytricha* macronuclear DNA: Phased nucleosomes and a telomeric complex. *Cell* 38: 501–510.
- Gottschling, D.E. and V.A. Zakian. 1986. Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* 47: 195–205.
- Graham, I. and A. Chambers. 1994. Use of a selection technique to identify the diversity of binding sites for the yeast RAP1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 22: 124–130.
- Gray, J.T., D.W. Celandier, C.M. Price, and T.R. Cech. 1991. Cloning and expression of genes for the *Oxytricha* telomere-binding protein: Specific subunit interactions in the telomeric complex. *Cell* 67: 807–814.
- Gualberto, A., R.M. Patrick, and K. Walsh. 1992. Nucleic acid specificity of a vertebrate telomere-binding protein: Evidence for G-G base pair recognition at the core-binding site. *Genes Dev.* 6: 815–824.
- Hardy, C.F.J., D. Balderes, and D. Shore. 1992a. Dissection of a carboxy-terminal region of the yeast regulatory protein RAP1 with effects on both transcriptional activation and silencing. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1209–1217.
- Hardy, C.F. J., L. Sussel, and D. Shore. 1992b. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6: 801–814.
- Henderson, E.R. and E.H. Blackburn. 1989. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 9: 345–348.
- Henderson, E., C.C. Hardin, S.K. Walk, I. Tinoco, Jr., and E.H. Blackburn. 1987. Telomere DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* 51: 899–908.
- Henikoff, S. 1991. Playing with blocks: some pitfalls of forcing multiple alignments. *New Biol.* 3: 1148–1154.
- Henry, Y.A., A. Chambers, J.S.H. Tsang, A.J. Kingsman, and S.M. Kingsman. 1990. Characterization of the DNA binding domain of the yeast RAP1 protein. *Nucleic Acids Res.* 18: 2617–2623. (Published erratum in *Nucleic Acids Res.* 18: 4317).
- Hicke, B.J. 1993. "Protein-DNA interactions at *Oxytricha nova* telomeres." Ph.D. thesis. University of Colorado, Boulder.
- Hicke, B.J., M.C. Willis, T.H. Koch, and T.R. Cech. 1994. Telomeric protein-DNA point contacts identified by photo-cross-linking using 5-bromodeoxyuridine. *Biochemistry* 33: 3364–3373.
- Hicke, B.J., D.W. Celandier, G.H. MacDonald, C.M. Price, and T.R. Cech. 1990. Two versions of the genes encoding the 41-kilodalton subunit of the telomere-binding protein of *Oxytricha nova*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1481–1485.
- Hicke, B.J., R. Rempel, J. Maller, R. Swank, J. Hamaguchi, E.M. Bradbury, D.M. Prescott, and T.R. Cech. 1995. Phosphorylation of the *Oxytricha* telomere protein: Possible cell cycle regulation. *Nucleic Acids Res.* (in press).
- Hofmann, J.F.-X., T. Laroche, A.H. Brand, and S.M. Gasser. 1989. RAP-1 factor is necessary for DNA loop formation *in vitro* at silent mating type locus *HML*. *Cell* 57: 725–737.
- Hope, I.A. and K. Struhl. 1986. Functional dissection of an eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46: 885–894.
- Huet, J., P. Cottrelle, M. Cool, M-L. Vignais, D. Thiele, C. Marck, J.-M. Buhler, A. Sentenac, and P. Fromageot. 1985. A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus. *EMBO J.* 4: 3539–3547.
- Huet, J. and A. Sentenac. 1987. TUF, the yeast DNA-binding factor specific for UAS_{pg}

- upstream activating sequences: Identification of the protein and its DNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 3648-3652.
- Ishikawa, F., M.J. Matunis, G. Dreyfuss, and T.R. Cech. 1993. Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)_n. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4301-4310.
- Keegan, L., G. Gill, and M. Ptashne. 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704.
- Kimmerly, W., A. Buchman, R. Kornberg, and J. Rine. 1988. Roles of two DNA-binding factors in replication, segregation and transcriptional repression mediated by a yeast silencer. *EMBO J.* **7**: 2241-2253.
- Kipling, D. and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**: 400-402.
- Klein, C. and K. Struhl. 1994. Protein kinase A mediates growth-regulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1 transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1920-1928.
- Klein, F., L. Thierry, M.E. Cardenas, J.F.-X. Hofmann, D. Schweizer, and S. M. Gasser. 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J. Cell Biol.* **117**: 935-948.
- Klobutcher, L.A. and D.M. Prescott. 1986. The special case of hypotrichs. In *The molecular biology of ciliated protozoa* (ed. J.G. Gall), pp. 111-154. Academic Press Orlando, Florida).
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 3015-3019.
- Kurtz, S. and D. Shore. 1991. RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast. *Genes Dev.* **5**: 616-628.
- Kyrion, G., K.A. Boakye, and A.J. Lustig. 1992. C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5159-5173.
- Kyrion, G., K. Liu, C. Liu, and A.J. Lustig. 1993. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**: 1146-1159.
- Landschulz, W.H., P.F. Johnson, and S.L. McKnight. 1988. The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* **240**: 1759-1764.
- Lipps, H.J., W. Gruissem, and D.M. Prescott. 1982. Higher order DNA structure in macronuclear chromatin of the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 2495-2499.
- Liu, Z. and W. Gilbert. 1994. The yeast *KEM1* gene encodes a nuclease specific for G4 tetraplex DNA: Implication of *in vivo* functions for this novel DNA structure. *Cell* **77**: 1083-1092.
- Liu, Z. and B.-K. Tye. 1991. A yeast protein that binds to vertebrate telomeres and conserved yeast telomere junctions. *Genes Dev.* **5**: 49-59.
- Liu, Z., J.D. Frantz, W. Gilbert, and B.-K. Tye. 1993. Identification and characterization of a nuclease activity specific for G4 tetrastranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 3157-3161.
- Lohman, T.M. 1984. Kinetics and mechanism of dissociation of cooperatively bound T4 gene 32 protein-single-stranded nucleic acid complexes. I. Irreversible dissociation induced by sodium chloride concentration jump. *Biochemistry* **23**: 4656-4665.
- Longtine, M.S., S. Enomoto, S.L. Finstad, and J. Berman. 1992. Yeast telomere repeat sequence (TRS) improves circular plasmid segregation, and TRS plasmid segregation involves the *RAP1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1997-2009.
- Longtine, M.S., M.E. Petracek, N.M. Wilson, and J. Berman. 1989. A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable

- from RAP1. *Curr. Genet.* **16**: 225–239.
- Lucchini, R., U. Pauli, R. Braun, T. Koller, and J.M. Sogo. 1987. Structure of the extrachromosomal ribosomal RNA chromatin of *Physarum polycephalum*. *J. Mol. Biol.* **196**: 829–843.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633–643.
- Lustig, A.J., S. Kurtz, and D. Shore. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* **250**: 549–553.
- Makarov, V.L., S. Lejnine, J. Bedoyan, and J.P. Langmore. 1993. Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* **73**: 775–787.
- McKay, S.J. and H. Cooke. 1992a. A protein which specifically binds to single stranded TTAGGG_n repeats. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1387–1391.
- . 1992b. hnRNP A2/B1 binds specifically to single stranded vertebrate telomeric repeat TTAGGG_n. *Nucleic Acids Res.* **20**: 6461–6464.
- Mitcham, J.L., A.J. Lynn, and D.M. Prescott. 1992. Analysis of a scrambled gene: The gene encoding α -telomere-binding protein in *Oxytricha nova*. *Genes Dev.* **6**: 788–800.
- Moreno, S. and P. Nurse. 1990. Substrates for p34^{cdc2}: *In vivo* veritas? *Cell* **61**: 549–551.
- Moretti, P., K. Freeman, L. Coodly, and D. Shore. 1994. Evidence that a complex of Sir proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* **8**: 2257–2269.
- Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J.Meyne, R.L. Ratliff, and J.-R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 6622–6626.
- Murray, A.W., T.E. Claus, and J.W. Szostak. 1988. Characterization of two telomeric DNA processing reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4642–4650.
- O'Connor, T.P. and J.E. Coleman. 1983. Proton nuclear magnetic resonance (500 MHz) of mono-, di-, tri- and tetradexynucleotide complexes of gene 5 protein. *Biochemistry* **22**: 3375–3381.
- Oka, Y., S. Shiota, S. Nakai, Y. Nishida, and S. Okubo. 1980. Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of *Stylonychia pustulata*. *Gene* **10**: 301–306.
- Olins, A.D., L.H. Cacheiro, A.L. Herrmann, M.S. Dhar, and D.E. Olins. 1993. Inaccessibility of the *Euplotes* telomere binding protein. *Chromosoma* **102**: 700–711.
- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* **75**: 543–555.
- Petracek, M.E., L.M.C. Konkel, M.L. Kable, and J. Berman. 1994. A *Chlamydomonas* protein that binds single-stranded telomeric DNA. *EMBO J.* **13**: 3648–3658.
- Prescott, D.M. 1983. The C-value paradox and genes in ciliated protozoa. *Mod. Cell Biol.* **2**: 329–352.
- . 1994. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.* **58**: 233–267.
- Price, C.M. 1990. Telomere structure in *Euplotes crassus*: Characterization of DNA-protein interactions and isolation of a telomere-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3421–3431.
- Price, C.M. and T.R. Cech. 1987. Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev.* **1**: 783–793.
- . 1989. Properties of the telomeric DNA-binding protein from *Oxytricha nova*. *Biochemistry* **28**: 769–774.
- Price, C.M., A.K. Adams, and J.R. Vermeesch. 1994. Accumulation of telomerase RNA and telomere protein transcripts during telomere synthesis in *Euplotes*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**: 267–275.
- Price, C.M., R. Skopp, J. Krueger, and D. Williams. 1992. DNA recognition and binding by the *Euplotes* telomere protein. *Biochemistry* **31**: 10835–10843.
- Prigodich, R.V., J. Casa-Finet, K.R. Williams, W. Konigsberg, and J.E. Coleman. 1984.

- ¹H NMR (500 MHz) of gene 32 protein-oligonucleotide complexes. *Biochemistry* 23: 522-529.
- Raghuraman, M.K. and T.R. Cech. 1989. Assembly and self-association of *Oxytricha* telomeric nucleoprotein complexes. *Cell* 59: 719-728.
- . 1990. Effect of monovalent cation-induced telomeric DNA structure on the binding of *Oxytricha* telomeric protein. *Nucleic Acids Res.* 18: 4543-4552.
- Raghuraman, M.K., C.J. Dunn, B.J. Hicke, and T.R. Cech. 1989. *Oxytricha* telomeric nucleoprotein complexes reconstituted with synthetic DNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 4235-4253.
- Rine, J. and I. Herskowitz. 1987. Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116: 9-22.
- Roth, M. and D.M. Prescott. 1985. DNA intermediates and telomere addition during genome reorganization in *Euplotes crassus*. *Cell* 41: 411-417.
- Runge, K.W. and V.A. Zakian. 1989. Introduction of extra telomeric DNA sequences into *Saccharomyces cerevisiae* results in telomere elongation. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1488-1497.
- Schierer, T. and E. Henderson. 1994. A protein from *Tetrahymena thermophila* that specifically binds parallel-stranded G4-DNA. *Biochemistry* 33: 2240-2246.
- Sen, D. and W. Gilbert. 1988. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334: 363-366.
- . 1990. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* 344: 410-414.
- Shampay, J., J.W. Szostak, and E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154-157.
- Shippen, D.E., E.H. Blackburn, and C.M. Price. 1994. DNA bound by the *Oxytricha* telomere protein is accessible to telomerase and other DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 405-409.
- Shoeman, R.L. and P. Traub. 1990. The *in vitro* DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *J. Biol. Chem.* 265: 9055-9061.
- Shoeman, R.L., S. Wadle, A. Scherbarth, and P. Traub. 1988. The binding *in vitro* of the intermediate filament protein vimentin to synthetic oligonucleotides containing telomere sequences. *J. Biol. Chem.* 263: 18744-18749.
- Shore, D. and K. Nasmyth. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51: 721-732.
- Shore, D., D.J. Stillman, A.H. Brand, and K.A. Nasmyth. 1987. Identification of silencer binding proteins from yeast: Possible roles in SIR control and DNA replication. *EMBO J.* 6: 461-467.
- Smith, F. and J. Feigon. 1992. Quadruplex structure of *Oxytricha* telomeric DNA oligonucleotides. *Nature* 356: 164-168.
- Starling, J.A., J. Maule, N.D. Hastie, and R.C. Allshire. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res.* 18: 6881-6888.
- Steinhilber, W. and H.J. Lipps. 1986. A telomere binding protein in the macronuclei of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. *FEBS Lett.* 206: 25-28.
- Sussel, L. and D. Shore. 1991. Separation of transcriptional activation and silencing functions of RAP1-encoded repressor/activator protein 1: Isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7749-7753.
- Sundquist, W.I. and A. Klug. 1989. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342: 825-829.
- Thompson, J.S., X. Ling, and M. Grunstein. 1994. Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* 369: 245-247.
- Tommerup, H., A. Dousmanis, and T. de Lange. 1994. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5777-5785.
- Travers, A.A., S.S. Ner, and M.E.A. Churchill. 1994. DNA chaperones: A solution to a persistence problem? *Cell* 77: 167-169.

- Tsang, J.S.H., Y.A.L. Henry, A. Chambers, A.J. Kingsman, and S.M. Kingsman. 1990. Phosphorylation influences the binding of the yeast RAP1 protein to the upstream activating sequence of the *PGK* gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7331–7337.
- Turner, R. and R. Tjian. 1989. Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* **243**: 1689–1694.
- Verdier, J.-M., R. Stalder, M. Roberge, B. Amati, A. Sentenac, and S.M. Gasser. 1990. Preparation and characterization of yeast nuclear extracts for efficient RNA polymerase B(II)-dependent transcription *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7033–7039.
- Vermeesch, J.R. and C.M. Price. 1994. Telomeric DNA sequence and structure following *de novo* telomere synthesis in *Euplotes crassus*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 554–566.
- Vermeesch, J.R., D. Williams, and C.M. Price. 1993. Telomere processing in *Euplotes*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5366–5371.
- Vignais, M.-L. and A. Sentenac. 1989. Asymmetric DNA bending induced by the yeast multifunctional factor TUF. *J. Biol. Chem.* **264**: 8463–8466.
- Vignais, M.-L., J. Huet, J.-M. Buhler, and A. Sentenac. 1990. Contacts between the factor TUF and RPG sequences. *J. Biol. Chem.* **265**: 14669–14674.
- Wang, S.S. and V.A. Zakian. 1990. Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4415–4419.
- Wang, W., R. Skopp, M. Scofield, and C.M. Price. 1992. *Euplotes crassus* has multiple genes encoding telomere-binding proteins and telomere-binding protein homologs. *Nucleic Acids Res.* **20**: 6621–6629.
- Wang, Y. and D.J. Patel. 1992. Guanine residues in d(T₂AG₃) and d(T₂G₄) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry* **31**: 8112–8119.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993. *Saccharomyces* telomeres acquire single-stranded TG₁₋₃ tails late in S phase. *Cell* **72**: 51–60.
- White, M.A., M. Wierdl, P. Detloff, and T.D. Petes. 1991. DNA-binding protein RAP1 stimulates meiotic recombination at the *HIS4* locus in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9755–9759.
- Williamson, J.R., M.K. Raghuraman, and T.R. Cech. 1989. Monovalent cation induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* **59**: 871–880.
- Wright, J.H., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* **6**: 197–210.
- Yu, G.L., J.D. Bradley, L.D. Attardi, and E.H. Blackburn. 1990. *In vivo* alternation of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* **344**: 126–132.
- Zahler, A.M., J.R. Williamson, T.R. Cech, and D.M. Prescott. 1991. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**: 718–720.
- Zimmerman, S.B., G.H. Cohen, and D.R. Davies. 1975. X-ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid. *J. Mol. Biol.* **92**: 181–192.
- Zhong, Z., L. Shiue, S. Kaplan, and T. de Lange. 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4834–4843.

第五章 酵母端粒:功能、结构与复制

Virginia A. Zakian

Division of Basic Sciences

Fred Hutchinson Cancer Research Center

Seattle, Washington 98104

端粒的功能:由酵母得出的启示

端粒,作为真核染色体必不可少的一部分,其概念的产生源于 Herman Muller 和 Barbara McClintock 在 20 世纪 30 年代的早期研究 (Gall 本书)。Muller 用 X 射线照射雄性果蝇,分析由此而产生的染色体重组。尽管他回收到了很多重组染色体,但是他没能回收末端缺失(即染色体缺少末端)的重组片段。他认为,染色体的末端肯定有一种特殊的结构,端粒,是维持线性染色体稳定必不可少的 (Muller 1938)。McClintock 通过玉米中断裂染色体的研究发现,断裂的末端与天然的末端不同,会与其他断端融合形成双着丝粒染色体,后者常会在以后的有丝分裂中断裂。这样,McClintock 的工作说明了端粒具有一个重要的功能,就是防止染色体间相互融合 (McClintock 1939, 1941; Gall 本书)。Muller 和 McClintock 在研究染色体时,还不知道 DNA 是遗传物质。随着 DNA 测序的出现,我们越来越清楚地看到染色体的最末端带有特殊的 DNA 序列。和大多数生物相同,果蝇端粒由简单重复的 DNA 序列的大量拷贝组成。在野生型的酵母中,每个染色体末端有约 $300 \pm 75\text{bp}$ 的 $C_2\sim_3A(CA)_{1\sim_6}/(TG)_{1\sim_6}TG_{2\sim_3}$ DNA,一般缩写为 $C_{1\sim_3}A/TG_{1\sim_3}$ (Henderson 见下文)。

直到最近,有关端粒 DNA 为必需物质的证据仍然是间接的,主要基于以下事实:在大多数生物体内,断裂的染色体是不稳定的。然而在果蝇中出现了矛盾,果蝇是发现端粒的第一个生物,但端粒不是必需的,因为一个完全缺乏端粒 DNA 的染色体仍然可以维持几十代。为了测定果蝇端粒的功能,以对照的方式构建了一个端粒可以被切除的染色体(见图 5-1) (Sandell & Zakian 1993)。这种“实验”染色体的构建如下:在染色体 VII 左臂上的端粒 $C_{1\sim_3}A/TG_{1\sim_3}$ 片段内侧,插入 HO 内切核酸酶的特异识别位点。还将 HO 基因的一个乳糖诱导拷贝导入到果蝇体内,并且将基因组中天然存在的 HO 位点去除。

将实验染色体引入到其他的单倍体株中,制成一个含有两条染色体 VII 的双体株 (Sandell & Zakian 1993)。因为它含有两个拷贝的染色体 VII,所以实验染色体可以在不影响细胞存活的情况下发生丢失。开始双体株产生红色的对环己酰亚胺(cycloheximide)敏感的菌落,失去实验染色体后,变成单倍体细胞,产生白色的抗环己酰亚胺菌落。除野生型双体株以外,还把实验染色体引入到 *rad 9* 株[缺少细胞周期关卡(checkpoint),该关卡使

DNA 有损伤的细胞停止在细胞周期中的 G_2 期]和 *rad52* 株(缺乏双链断裂后重组修复的主要途径)中。

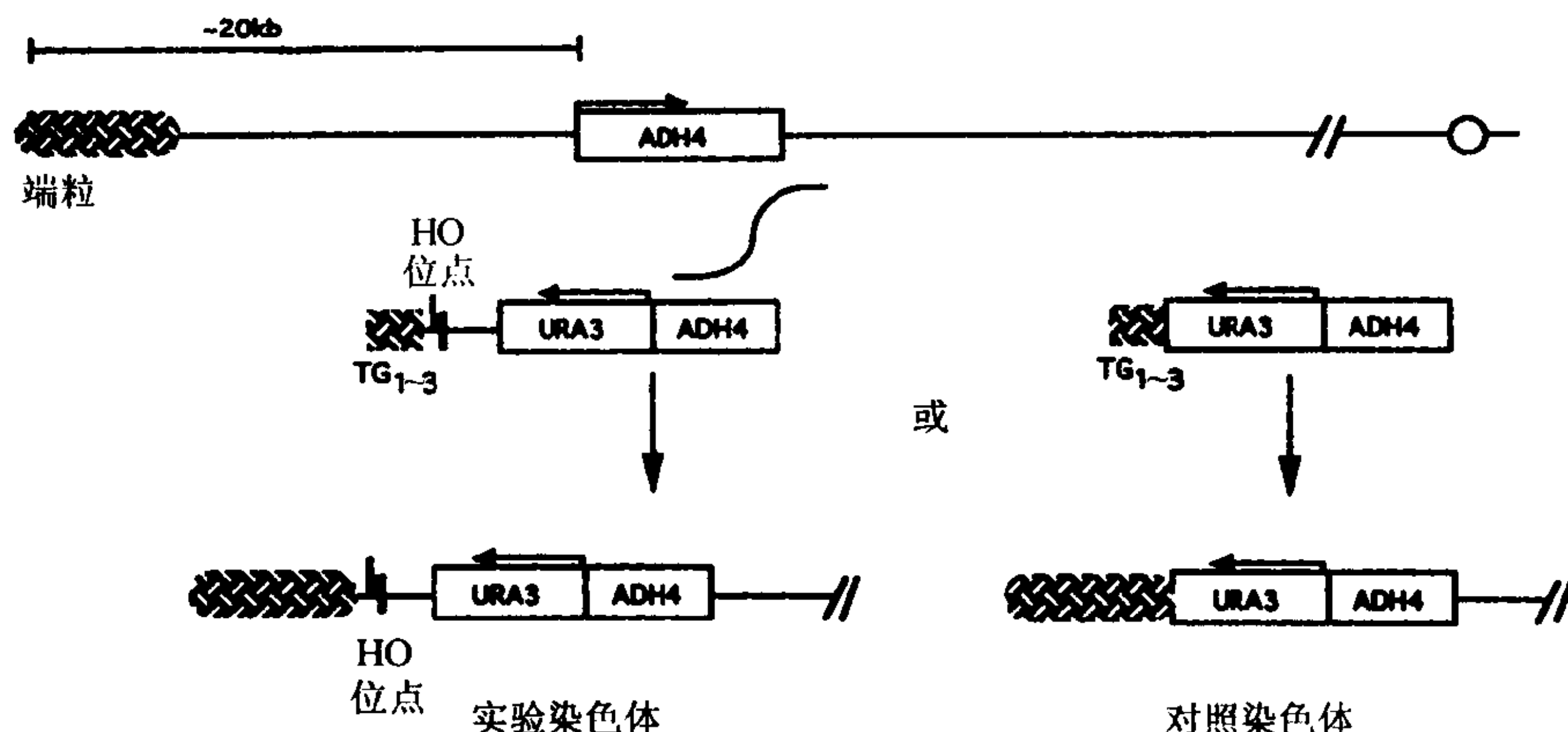


图 5-1 染色体的构建

用一种可控制的方法去掉染色体的一个端粒。制备实验染色体时,在染色体 VII 的左侧端粒处插入一个片段含有 *URA3* 基因,一个 *HO* 内切核酸酶的识别位点和一个 $C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ 短片段,这个片段可以在体内延伸成一个全长的端粒。对照染色体完全相同,只是缺少 *HO* 识别位点。在建立实验和对照染色体时,约 20kb 的碱基从染色体 VII 上删除。(授权转载 Sandell & Zakian 1993。)

通过 Southern DNA 印迹杂交观察,在乳糖培养基中诱导产生的 *HO* 内切核酸酶会有效地从实验染色体株中除去端粒。DNA 印迹杂交和遗传分析也证明了断裂内侧的 DNA 最终失去很有可能是由降解造成的。单细胞观察实验发现,一个染色体一个末端的端粒的去除,将会引起由 *RAD9* 关卡介导的细胞周期的停止。这些数据表明,*RAD9* 途径对 DNA 损伤特别敏感,可以发现单个双链断裂。因此,端粒的一个最重要的功能就是使细胞区别完整的染色体和断裂的染色体(Sandell & Zakian 1993)。

在消除端粒后出现的高染色体丢失率中可以推断出,酵母端粒也在染色体维持方面起着积极的作用。在 *rad9* 株中,端粒的丢失不会引起细胞周期的停止,未发现缺乏端粒的稳定染色体。而且,在除去端粒以后,实验染色体在 90% 的 *rad9* 细胞中都已经丢失。就是在易于发现和修复断裂染色体的野生株中,也有约 30% 的细胞丢失了无端粒的染色体。这与果蝇不同,酵母端粒对于染色体稳定是绝对必要的(Sandell & Zakian 1993)。没有端粒的染色体一定要通过重组修复或重新加入端粒(Blackburn 本书;Coke 本书)等方式得到新端粒,或者这个染色体干脆丢失(很明显被降解)。

有趣的是,缺乏一个端粒的染色体也可以复制、分裂几次,然后才出现染色体丢失(Sandell & Zakian 1993)。端粒切除后,有相当一部分细胞产生了白色的菌落,菌落中心附近有红斑(见图 5-2)。红斑说明当其后代最终形成菌落的细胞放入培养皿时,实验染色体是存在的。通过分离分化的细胞和记录菌落形成的类型,发现细胞丢失实验染色体需要 4~10 次的分裂。由于菌落中大多数细胞都缺少实验染色体,很有可能在没有端粒存在下,实验染色体在这 4~10 次分裂中不稳定扩增。这一结果说明,尽管断裂染色体还没有得到新的端粒,但是带有单一断裂染色体的细胞仍可以逃避 *RAD9* 介导的停止。而且能够在有限的几次细胞分裂中使断裂染色体增殖,因此,虽然端粒是酵母染色体长期稳定所

必需的,但对特定细胞周期中染色体的复制和分离又不是必需的。

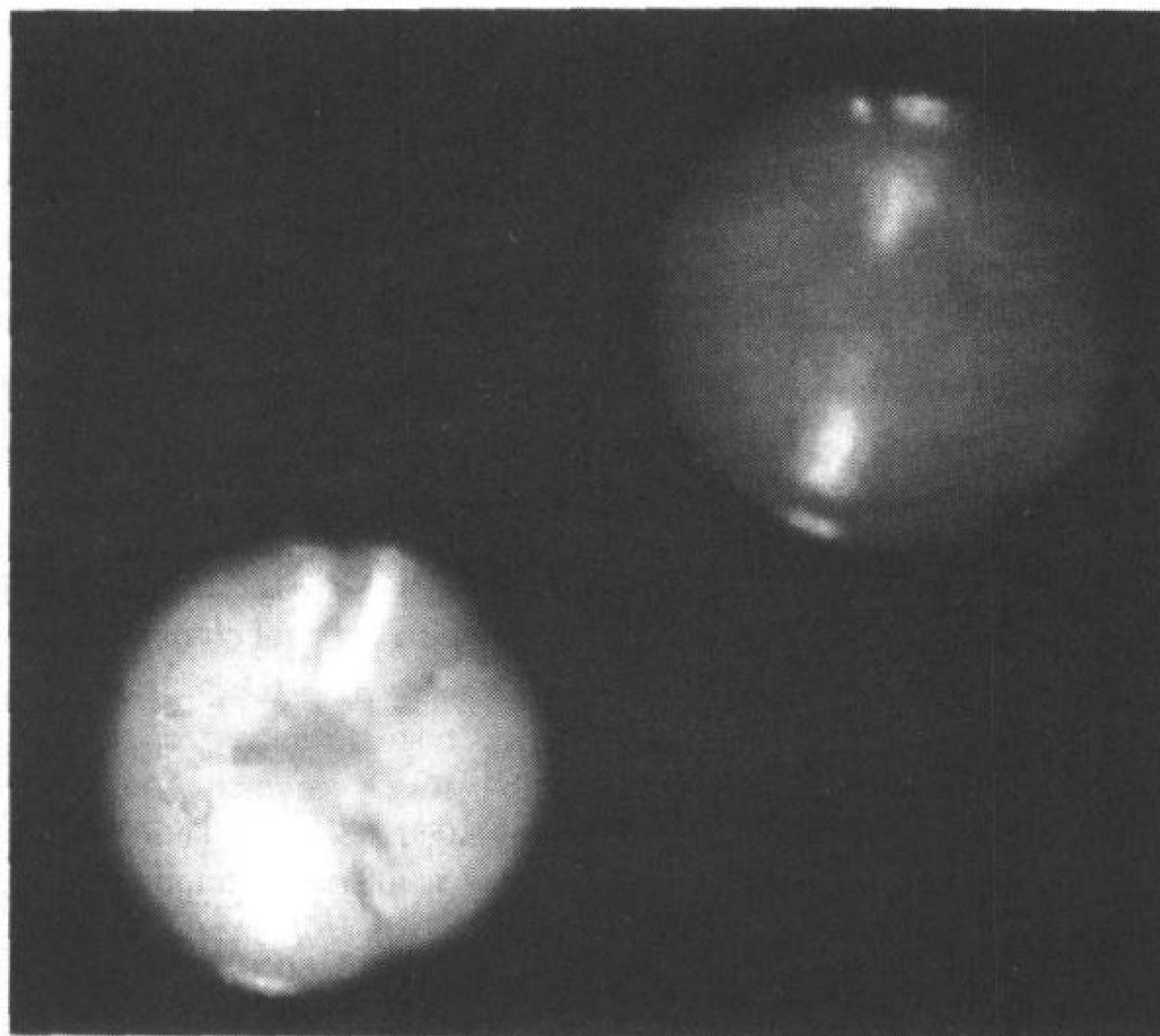


图 5-2 图中所示为一个含有实验染色体

(图 5-1)和乳糖诱导的 *HO* 内切核酸酶基因拷贝的染色体Ⅵ双体株。在乳糖培养基中生长 24h,然后铺板形成单个细胞。开始的双体株产生红色的菌落,从视觉上找不出与红色菌落有任何差异,图中只可看出颜色略暗。丢失实验染色体后,细胞产生白色菌落。尽管红色菌落在外表上与开始双体株相似,但它是 Ura^- ,且其端粒在乳糖培养基上发生了丢失。在端粒丢失后,断裂的染色体重新稳定,克隆的菌落绝大部分是红的可以证明这一点。稳定染色体的丢失率同开始的染色体Ⅵ的丢失率没有差别,小的白色形扇区代表稳定实验染色体的自发丢失,在每次细胞分裂中发生率约为 10^{-5} 。达到稳定的途径有同源重组或重新加入端粒。约为 30% 的细胞产生中间带有红色的白色菌落。菌落大部分为白色,说明大部分菌落中不存在实验染色体,红色的中心说明,在细胞置入培养皿时,还存在有实验染色体。红斑的大小表明实验染色体被复制或分离的情况,经过 4~10 次细胞分裂周期,然后发生了丢失。

端粒可以帮助酵母细胞分辨含有完整还是断裂的染色体,保护染色体免于发生融合和降解。除此以外端粒还有其他的功能。一般的 DNA 聚合酶不能把线性 DNA 分子复制到最末端。端粒为另一个端粒特异性的复制机制提供了一个很好的底物,与纤毛虫和脊椎动物相同,酵母端粒的复制也是通过端粒酶机制完成的(Greider 本书)。然而在有些情况下,非端粒酶机制也可能参与端粒的复制(见下文)。细胞学研究发现,在很多的生物体内,端粒常见于核周边部和(或)与其他端粒相连(Dernburg 本书)。有关酵母的研究表明,端粒与端粒附近的基因的转录控制有着一定关系(见下文)。

酵母染色体末端的简单重复序列

第一个测序的端粒就是来自有纤毛原生生物的巨核亚染色体的 DNA 分子末端。研究表明四膜虫核糖体 DNA (rDNA) 分子的末端带有 C_4A_2/T_2G_4 重复序列 (Blackburn & Gall 1978), 大多数尖毛虫和与之相关的纤毛虫端粒带有 C_4A_4/T_4G_4 重复序列 (Oka et al. 1980; Klobutcher et al. 1981; Boswell et al. 1982; Henderson 本书)。研究酵母端粒中取得的一个突破性的结果是, 证明了四膜虫 (Szostak & Blackburn 1982; Dani & Zakian 1983) 和尖毛虫 (Pluta et al. 1984) 的天然末端在酵母中也具有端粒活性。一般来讲, 线性片段在酵母中的转化率并不高, 通常通过形成环或插入染色体中进行转化。然而当来自四膜虫 rDNA 或尖毛虫总 DNA 的末端限制片段连接到酵母载体的两端, 并通过转化导入酵母中, 则转化的效果很好, 载体也以染色体外的线性质粒维持下来。在这两种情况下, 纤毛虫末端在酵母中扩增后, 增加约 300bp (Szostak & Blackburn 1982; Pluta et al. 1990a)。加入到纤毛虫末端的 DNA 是酵母端粒 DNA (Pluta et al. 1984; Shampay et al. 1984; Wang & Zakian 1990a)。DNA 片段能够维持呈线性质粒的能力并不一定说明这一片段在酵母起到端粒的功能。然而, 这一功能性克隆试验验证了 DNA 序列对加入酵母端粒 DNA 起到的底物作用 (见下文)。

采用改进的功能克隆试验分离真正的酵母染色体末端 (Szostak & Blackburn 1982)。从含有线性质粒克隆 (每端带有四膜虫末端) 的细胞中提取总 DNA, 用可以除去质粒一个末端的酶将其消化, 将所得的混合物连接并转化回酵母中。一些含有线性质粒的转化子带有 2.5kb 的酵母 DNA 片段, 该片段代替了缺失的四膜虫末端。每个单倍体细胞中 30~40 拷贝含有酵母片段, 含这些片段的质粒是呈线性形式存在的。

在功能克隆试验中克隆并测序了提供端粒功能的部分酵母片段 (Shampay et al. 1984)。测定酵母端粒的序列为 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$, 与四膜虫和尖毛虫端粒 DNA 的片段相关。然而, 酵母重复序列与纤毛虫或其他真核细胞中发现的精确的重复序列相比, 显得很不规则。尽管存在有这样的不规则, 但是 $TG_{1\sim3}$ 寡核苷酸能够在体外以 GG 碱基对结合的形式, 形成平行或反平行 DNA 结构 (Sen & Gilbert 1988; Lustig 1992; Venczel & Sen 1993; Giraldo & Rhodes 1994; Giraldo et al. 1994; Henderson 本书)。

在冷核苷酸存在的条件下, 用 T4 DNA 聚合酶处理线性质粒末端的限制片段, 克隆该片段并测出整个端粒的 DNA 序列 (Wang & Zakian 1990a)。由于这种方法几乎不丢失双链的端粒 DNA, 因此它可以用来分离全长的端粒。这一研究表明, $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ DNA 扩展到线性质粒的最末端。另外分析还发现, 约 300bp 酵母端粒由两个大约相等大小的区域组成。通过测定同一段端粒的多个拷贝, 发现来自于同一亲本质粒的端粒内部具有相同的 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 序列。然而, $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 序列的远端部位在这些端粒中有很大的不同 (尽管所有端粒两部分都含有 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 共有序列)。因此, 与远端的部分相比, 酵母端粒的近端部分可能相对地受到保护且不被降解或延长 (Wang & Zakian 1990a)。

典型的野生株中单一段端粒含有约 300 ± 75 bp 的 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ DNA 片段 (Shampay & Blackburn 1988; Wright et al. 1992)。然而该片段的长度可以自发地增加或减少, 表明正常情况下端粒 DNA 是可以延伸或降解的 (Shampay & Blackburn 1988)。通过改变复制和

降解之间的平衡关系,突变和其他的干扰可以改变细胞内所有端粒的平均长度。例如,*EST1*基因可能是端粒复制所必需的,所以在没有这种基因存在时端粒就会变短(Lundblad & Szostak 1989),而*PIF1*基因编码的DNA解旋酶(Lahaye et al. 1991)可能会抑制端粒复制,那么丢失Pif1p就会引发长端粒的形成(见下文)(Schulz & Zakian 1994)。其他基因,如*RAP1*(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990; Sussel & Shore 1991; Kyrion et al. 1992)和*RIF1*(Hardy et al. 1992),编码结构蛋白,这些蛋白可与酵母端粒相互作用(Fang & Cech 本书; Shore 本书)。*RAP1*如果发生突变,可以降低其结合活性,则会引起端粒的缩短(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990),而去除*RIF1*(为一种能与Rap1p羧基末端反应的蛋白质),会导致长端粒的形成(Hardy et al. 1992; Shore 本书)。这样,结构蛋白质可能保护端粒免受降解(Rap1p)或延长(Rif1p)。大量表达Rap1p缺失的衍生物(含有羧基末端,但不含有DNA结合区域)也会引起端粒的延长,可能是通过蛋白质如Rif1p等远离染色体端粒的作用(Conrad et al. 1990)。另一种情况也可以影响端粒长度,即引入过量的 $C_1\sim_3A/TG_1\sim_3DNA$ 片段。当向细胞内引入很多的 $C_1\sim_3A/TG_1\sim_3DNA$ 片段作为额外端粒或作为环状质粒的内部片段,细胞内所有的端粒都会延长(Runge & Zakian 1989)。

首先确定维持酵母端粒有关的基因研究涉及到筛选变异细胞群,可以采用Southern印迹杂交方法筛选带有比野生型细胞端粒长或短的细胞株(Lustig & Petes 1986)。这一研究确定出*TEL1*、*TEL2*基因的变异可以影响端粒的长度:*tel1-1*细胞的端粒长度仅为50~100bp,而在*tel1-2*细胞中的端粒长度为100~150bp。这两株中,端粒长度的缩短会发生表型延迟,变异表型全部表现出来需要150次分裂(Lustig & Petes 1986)。同样,表型延迟也见于其他基因或影响端粒长度的一些因素(Carson & Hartwell 1985; Runge & Zakian 1989)。在37℃时,*TEL1*或*TEL2*的变异引起生长的减慢,但必须是在端粒达到它们足够短的长度之后(K. W. Runge & V. A. Zakian 待发表)。生长缓慢表现型被用于克隆*TEL2*基因。*TEL2*基因是一个必需基因,编码418个氨基酸的多肽,与数据库中的所有蛋白质无任何明显相似性(K. W. Runge & V. A. Zakian 待发表)。*TEL1*为非必需基因,编码一个非常大的多肽,可预测其分子质量为322kDa,其羧基端序列与PI3激酶的序列有相似性(P. Greenwall et al. 未发表)。与野生型细胞相反,在引入额外端粒DNA或Rap1p羧基末端大量表达时,*tel1*和*tel2*细胞端粒长度不发生变化(K. W. Runge & V. A. Zakian 待发表)。尽管*tel1-1*细胞具有正常的端粒位置效应(TPE)(Shore 本书),但TPE在*tel2-1*细胞中减弱(K. W. Runge & V. A. Zakian 待发表)。*SIR3*或*SIR4*(TPE需要的另两个基因)的缺失(Aparicio et al. 1991)也会引起端粒长度在一定程度上缩短(Palladino et al. 1993)。

其他条件或变异可以间接地影响端粒的长度。例如有些株中,在将葡萄糖生长细胞移入到乳糖培养基中后,端粒的长度缩短约25bp(Sandell et al. 1994)。在某些带有*CDC17*等位基因(编码DNA聚合酶I的催化亚基)株中(Johnson et al. 1985),在细胞生长的半允许温度下时,端粒会变长(Carson & Hartwell 1985)。同样带有某个*CDC44*等位基因的细胞,编码RFC(DNA复制因子C)一种亚基(共5个亚基)的基因(Campbell 1993),在允许温度下形成长端粒(C. Holm & A. Adams 个人通讯)。*CTF18*(编码一种与RFC亚基相似的蛋白质的非必需基因)上的变异(Kouprina et al. 1994),会引起染色体丢失数

目增加,同时使端粒缩短(F.Spencer, P.Hieter, and V. Lundblad, 引自 Campbell 1993)。

$C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ 重复序列内侧的中等重复 DNA 元件

除了在染色体最末端的 $C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ 重复序列外,酵母端粒还带有中等重复 DNA 序列,叫做端粒相关(telomere-associated, TA)重复序列,这也是其他真核生物染色体的特点(见图 5-3)(Henderson 本书)。在每个端粒中可见 Y' TA 重复序列的 0 到 4 个串联拷贝(Chan & Tye 1983b)。在带有 Y' 端粒中,Y' 直接与末端 $C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ 重复序列相连。Y' 以不同的大小存在,有两种主要的类型,Y' 长与 Y' 短,分别为 6.7kb 和 5.2kb(Chang & Tye 1983a)。Y' 短为 Y' 长缺失后的衍生物(Louis & Haber 1990b)。Y' 重复序列含有两个大的可读框(ORF),都可以被转录(Louis & Haber 1992)。不同 Y' 重复序列间的变化常会中断 ORF1,但很少打断 ORF2。ORF2 中有一部分(27%)与 RNA 解旋酶具有序列一致性(Louis & Haber 1992)。

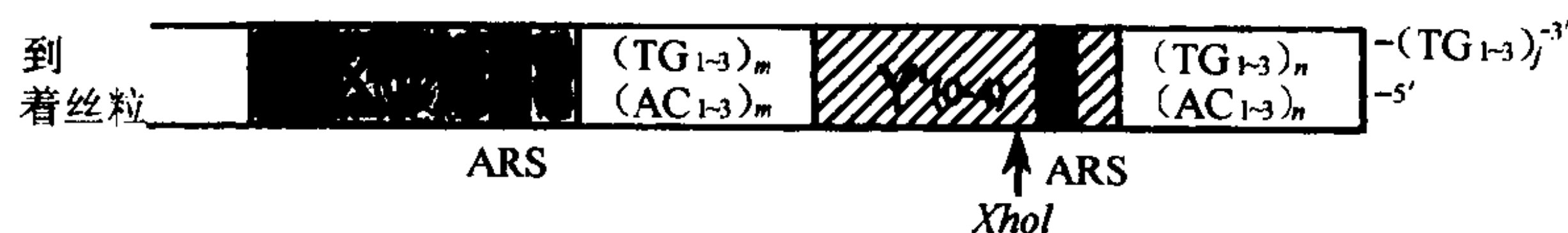


图 5-3 酵母端粒结构

每个酵母染色体的两端有约 $300\pm 75\text{bp}$ 的 $C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ DNA。除这些简单的重复序列以外,大多数(也许是全部的)酵母端粒带有中等重复元件,叫做端粒相关(TA)DNA。在酵母中共有两类 TA DNA, X 和 Y'。端粒中约有 2/3 有一个或多个中等重复 Y' 元件的拷贝,直接接在 $C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ 重复序列的内侧。Y' 是一种很保守的序列,有两类变体,长度分别为 6.7 和 5.2kb。X 含有几个较小的重复序列,研究得还不很深入。在串联的 Y' 元件之间和当 X 和 Y' 同在一条端粒上时 X 与 Y' 间常可以见到 $C_1\sim_3A/TG_{1\sim_3}$ DNA 片段。X 和 Y' 都有一个 ARS。在 S 期结束后, $TG_{1\sim_3}$ 链以单链尾的形式存在,长度在 30 碱基以上。

在不同实验室研究的酵母株间,Y' 的染色体分布变化很大(Zakian & Blanton 1988; Louis & Haber 1990b)。另外,在同一株内,在减数分裂期和有丝分裂期,Y' 重复序列可以从一个染色体移到另一个染色体(Horowitz et al. 1984; Louis & Haber 1990a)。通过遗传标记 Y' 重复序列,可以详细研究有丝分裂时 Y' 重复序列的移动现象。这些研究揭示,没有 Y' 的端粒可以得到 Y', 具有 Y' 的端粒可能会丢失 Y', 单一的 Y' 能够被串联地复制(Louis & Harber 1990a)。

鉴于果蝇的 TA 重复序列是可以转座的(Pardue 本书),我们自然会推测,Y' 的移动是通过转座作用实现的。然而,转座不能解释 Y' 在数目和位点上发生的许多变化(Louis & Habr 1992)。可以更确切地说,Y' 序列的移动主要发生在依赖 *RAD52* 的重组过程中。Y'-Y' 重组可以发生在非同源染色体间或姐妹染色单体间(Louis & Haber 1990b)。尽管 Y' 长与 Y' 短序列有 5kb 以上的同源序列,但是大多数 Y'-Y' 重组发生在一类同长度的 Y' 之间(57/65)(Louis & Harber 1990a)。对于这种行为的一种可能解释是,端粒中特定的亚

端粒部分在位置上是相关的,所以在有丝分裂时,特别易于发生 Y'-Y' 相互重组。Y'-Y' 重组的发生频率与其他重复序列 DNA 间的重组频率相同(Louis & Harber 1990a)。

第二类 TA 序列是 X(Chan & Tye 1983b)。X 在长度上变化很大,介于 0.3~3.75kb 之间。这种变化反映出 X 不是一种分立的元件。X 至少包括有 5 种小的重复序列,大小介于约 35~560bp 之间,每一个 X 并不是包含所有的重复序列。其中 560bp 的重复序列叫做核心 X,存在于大多数的端粒内。当 X 位于缺乏 Y' 的端粒上时,X 与末端的 C₁₋₃A/TG₁₋₃ DNA 片段相邻。当 X 和 Y' 同位于一个端粒上时,X 则位于 Y' 的内侧(Chan & Tye 1983b)。在这些情况下,50~130bp 的 C₁₋₃A/TG₁₋₃ DNA 片段常见于 X-Y' 结合处(占 3/8)(Walmsley et al. 1984; Louis et al. 1994),在一些或所有串联 Y' 中也发现了同样长度的 C₁₋₃A/TG₁₋₃ DNA 片段(Walmsley et al. 1984)。DNA 测序表明,X 样重复序列出现在染色体 III 的两个非端粒位点上(Oliver et al. 1992);但这些重复序列并不是 X,而是 Ty5 或者为 Ty5 的衍生物(Voytas & Boeke 1992)。每个 X 和 Y' 含有一个自主复制序列(ARS)或者是潜在复制起始点(Chan & Tye 1980,1983b),它可以实现质粒 DNA 的自主复制,而在有些情况下,起到染色体上复制起始点的作用(Campbell & Newlon 1991)。

酵母 TA DNA 有什么功能呢? 因为一个或多个双臂缺乏 Y' 的染色体可存在于大多数的酵母株中,所以顺式的 Y' 不是稳定染色体所必需的(Zakian & Blanton 1988; Jaeger & Philippsen 1989)。然而 Y' 编码的蛋白质对于染色体稳定性或细胞生长的某些方面可能起着重要的且必不可少的作用。由于 X 的序列变化很大,很难确定它是否出现于每个端粒中。对 4 个株的两个进行了脉冲场凝胶电泳检查和 Southern 印迹杂交,发现最小的酵母染色体——染色体 I,缺乏可检测到的 X 和 Y' 序列(Zakian & Blanton 1988)。然而我们还不清楚本实验所采用的 X 探针是否含有 X 重复序列中所有的 5 种类型。对染色体 I-R 端粒附近的 DNA 进行克隆,发现该片段缺乏 Y',但是含有一段存在于基因组中其他两个位点上的序列,这很有可能是某些 X 中的小重复序列之一,不大可能是为数更多的核心 X 序列(Venter & Horz 1989)。在另一个株内,染色体 V 的右侧末端不与核心 X 杂交,但是的确含有 Y'(Renauld et al. 1993)。这样,尽管不是每个端粒中都有 Y' 或核心 X,但是是否存在同时缺乏 X 和 Y' 的天然端粒还不清楚。

因为 X 和 Y' 都含有 ARS,那么 TA DNA 一个可能的功能就是提供端粒特异性的复制起始点。正如双向凝胶电泳测定的结果那样,一些 Y' 在复制中间表现出复制泡(bubble arc)形式,所以作为起始点它们是很活跃的(Ferguson et al. 1991)。为了检查特定 TA ARS 的活性,按照改良的双向凝胶电泳方法(Brewer et al. 1992),对复制叉移动的方向进行分析,检查 TA 元件内侧的单一序列 DNA。采用这种方法,染色体 III 左臂上 X ARS 很少或根本不用作复制起始点(Newlon et al. 1993)。(此株端粒上不含 Y'。)而且,酵母人工染色体(YAC)在两个臂上缺乏端粒样 ARS,可以有效地转化酵母,即使在有丝分裂和减数分裂时,能够保持像带有端粒 ARS 的 YAC 一样稳定(Wellinger & Zakian 1989)。这样,端粒 ARS 对于建立和维持端粒来说不是必需的。

尽管还没有发现天然的酵母染色体明显缺乏所有的 TA DNA,但是还是可以构建出缺失 TA DNA 的染色体衍生物。一种缺乏 X 和 Y' 的染色体 III,在减数分裂与有丝分裂时有正常的稳定性(Murray & Szostak 1986)。然而在构建这种染色体时,来自四膜虫 rDNA

的末端限制片段被用作端粒形成的底物,这些片段含有端粒 *ARS* 和其他的序列。染色体 VII, 是酵母染色体中最大的一条染色体 (Carle & Olson 1985), 含有 X 和 Y' (Zakian & Blanton 1988)。然而完全缺乏 TA DNA 的染色体 VII 的缺失衍生物, 就像未加修饰的染色体 VII (含有 X 和 Y') 一样, 在有丝分裂和减数分裂时一样稳定 (S.-S. Wang et al. 待发表)。所以顺式作用中的 TA DNA 在正常细胞周期中不是染色体稳定性所必需的。

尽管在顺式作用中 TA DNA 不是必需的, 但是当末端片段 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 丢失时, 它也非常可能, 会发挥出结构作用。在带有 *EST1* 基因变异的细胞中, 端粒变得越来越短, 很多的培养细胞发生死亡 (Lundblad & Szostak 1989)。有一小部分细胞不发生死亡, 但是生长速度比正常细胞约慢两倍 (Lundblad & Blackburn 1993)。这些成活的细胞的大部分端粒或全部端粒已经获得了多拷贝的全长或缺失的 Y' 元件 (见下文)。另一种可能是 TA 序列起到了被动缓冲液的作用, 免于端粒对附近基因的转录抑制 (Shore 本书), 或者促进端粒连接基因的扩增。当提高基因表达对细胞的存活至关重要时, 它会赋给细胞一定的选择优势 (Walton et al. 1986; Dorsey et al. 1992)。

酵母端粒对附近 DNA 转录的影响

TPE 指的是酵母端粒抑制附近基因组转录的能力 (Gottschling et al. 1990)。这种转录抑制具有亚稳定性, 即在一群细胞中, 与端粒相连的基因在有些细胞中受到抑制, 而在另一些细胞中则不受抑制。在野生型的细胞中, 一个决定端粒相连基因表达的“开”和“关”的状态是相对稳定的, 并且这两种状态是可以相互转化的。TPE 在酵母中是一种普遍现象, 可见于所有的野生型株中、所有的端粒内以及所有测定的聚合酶 II 转录的基因中。Shore 对 TPE 介绍的最为详细 (本书)。

沉默接合型基因的转录抑制需要很多基因 (包括 *SIR2*、*SIR3*、*SIR4*、*ARD1* 和组蛋白 H4 的氨基末端), 这些基因也为 TPE 所必需 (Aparicio et al. 1991)。*SIR3* 和 *SIR4* 基因的变异能够去除细胞所有端粒中的 TPE。在单个端粒上, TPE 也可以以顺式的形式被去除 (Sandell et al. 1994)。一个乳糖诱导启动子——*GAL10*, 被插入到端粒连接 *URA3* 基因和端粒间。当带有这种染色体的细胞生长于乳糖培养基中时, 整个端粒 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 片段则被转录, TPE 在大多数转录端粒的细胞中被去除。尽管 TPE 可以通过端粒转录去除, 但是不会影响被转录的染色体在有丝分裂中的稳定性。所以在给定的染色体端粒中, TPE 的作用能够被减轻而不影响它的复制、分离或完整性。由于端粒是维持染色体稳定性所必不可少的 (Sandell & Zakian 1993), 所以端粒结构对于 TPE 是很重要的, 而这种结构必须与端粒稳定功能所需要的结构相区别。

$C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ DNA 的内部片段也能抑制附近基因的表达, 这种现象叫做基于 $C_{1\sim3}A$ 的沉默 ($C_{1\sim3}A$ -based silencing, CBS) (Stavenhagen & Zakian 1994)。当 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 片段置于环状染色质中后, 也会发生这种现象, 因此 CBS 是不依赖于端粒的顺式作用现象。然而, 当 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 片段与端粒靠的很近时, 表现出 CBS 现象的细胞数增加。端粒与 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ DNA 内部片段具有的协同性甚至可见于远离端粒的位置 (这里没有发现 TPE)。与 TPE 相同, CBS 是所有野生株中的一种普遍现象, 也是所有检测的 pol II 转录

基因所具有的现象,还见于全部五个染色体位点处,包括三个不同的染色体位点。所有检测到的影响 TPE 的基因也影响 CBS。Sir1p 为沉默 *HM* 位点所必需,而非 TPE 和 CBS 所必需。

在酵母中是否存在正常表达受到 TPE 或 CBS 控制的基因呢? 酵母端粒附近的区域有一个密度相对较低的可读框(Oliver et al. 1992; Dujon et al. 1994),也许是因为置于端粒附近的基因有某些选择,在这里基础的表达也被影响。*PHO11*,其启动子距染色体 I 右末端 5kb,是目前确定出的距端粒最近的一个基因(Venter & Horz 1989)。在大多数的端粒中,TA 重复序列使其他基因远离端粒,因此它们的表达不受端粒的抑制(Renauld et al. 1993)。但是当 *URA3* 离端粒 3.5kb 时,这一距离内未发现 TPE,如果此时除端粒以外,在基因的内侧还有 $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ DNA 片段,那么它的细胞受抑制率为 1.5% (Stavenhagen & Zakian 1994)。因此,基因距端粒的距离不足以预测它的表达是否受 TPE 的影响。

很难理解的是,某些种类的基因主要见于或只见于端粒的附近。这些基因是需要不同碳源发酵的多基因家族的成员,它们包括 *SUC* 基因(发酵蔗糖)、*MAL* 基因(麦芽糖)、*MEL* 基因(melbiose)。*SUC* 基因可以定位于 6 个位点中的任何一位点上,每个位点都在不同的染色体上,尽管大多数菌株并不是在每个位点上都有一个基因。这些位点中除一个以外都接近端粒。端粒连接的 *SUC* 基因位于 X 和 Y' 元件之间(Carlson et al. 1985),一般距 Y' 4kb,距染色体末端 11kb 或更远一些。携带 *MAL* 基因的基因座共有 5 个;4 个已绘出图谱的基因座在不同染色体上的右端粒上。与 *SUC* 基因不同,*MAL* 基因未嵌镶在 TA DNA 中,而是在其内侧有单一序列(Charron et al. 1989)。*MAL1* 与 *SUC1* 紧密相连,与 *MAL3* 和 *SUC3* 间的关系相同(Charron et al. 1989)。可以携带 *MEL* 基因的 10 个不同的基因座都位于不同染色体中的左端粒附近(Turakainen et al. 1993)。还不清楚这些基因的表达是否受近端粒位置的影响,但是端粒重组很可能影响这些基因以及其他与端粒相连的基因在不同菌株中数目和位置的变化(Carlson et al. 1985; Venter & Horz 1989)。

其他表达受到近端粒影响的基因有位于 Y' 内的两个可读框。当它们位于 *est1* 细胞内时,端粒可能变得越来越短,在每个有 TPE 的细胞的端粒部分会进行性地减少。丢失 TPE 可能会使 Y' 可读框的表达达到很高水平,这种表达在一定的程度上可能引发 Y' 的重组。重组一般发生在幸存的一些细胞内,因为那时大多数 *est1* 细胞都已经死亡(Lundblad & Blackburn 1993; 见下文)。

位于特殊染色质结构中的端粒和亚端粒 DNA

处于酵母染色体末端的 $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ 重复序列存在于非核小体染色质结构中,叫做端体。这个结论是根据通过总 $C_{1-3}A$ DNA 表现出来的核酶保护模式和每个端粒的染色质结构得出的(Wright et al. 1992)。端体保护 245~395bp DNA 的序列,它包括全部 $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ DNA 的末端片段和 50bp 的相邻序列。这样,端体比核小体含有更多的 DNA 序列。而且,看起来端体不是以核小体为核心建立起来的。端体有相对的盐不稳定性,在 370mmol/L NaCl 中大部分解离(Wright & Zakian 1995),盐稳定性要比典型的核

小体低得多。另外,端体中至少有一些蛋白质与 DNA 的相互作用在高浓度的溴化乙锭中是稳定的,而核小体在此环境下则解离(Wright & Zakian 1995)。端体中如果含有一个或多个核小体时,组蛋白化学计量上的变化不会破坏端粒染色质(Norris et al. 1988)。

与 $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ 重复序列不同,X 和 Y' 是以核小体形式组装的,当 *URA3* 位于端粒附近时,情况也一样(Wright et al. 1992)。无论基因位于端粒或其他位置,核小体在特定的 DNA 序列中的位置都是相同的(Wright et al. 1992)。然而,亚端粒 DNA 中的核小体与基因组中其他大多数区域的核小体不同。当 *URA3* 基因在染色体 V 的端粒附近时,*URA3* 中的 DNA *dam* 甲基化酶(*dam* methylase)识别位点比它在正常位置(即靠近着丝粒)更不易接近(Gottschling 1992)。另外,亚端粒区域染色体上的组蛋白与基因组上其他部位的组蛋白相比,都是低乙酰化的(hypoacetylated)(Braunstein et al. 1993)。在除去 TPE 的突变体中,DNA *dam* 甲基化酶难以接近和组蛋白的低乙酰化现象都会消失。一个较大可能性是,DNA *dam* 甲基化酶不易接近和(或)组蛋白低乙酰化的区域可能反映了端粒表现 TPE 活性与端粒的距离之间的关系。

有一个约为 100 bp 的区域,它将端体与附近的核小体相连,这个区域特别易于与核酸酶或修饰 DNA 的酶接近。在核内,这个区域对微球菌核酸酶、DNA 酶 I (Wright et al. 1992)、*Bam* HI (Conrad et al. 1990) 特别敏感。这个特别敏感的区域与接近端粒有关,因为如果同样的序列位于内部位置,它就会变得对 DNA 酶 I 不敏感(Wright et al. 1992)。在体内,这个高敏感区易与 HO 内切核酸酶(Sandell & Zakian 1993)和 *dam* 甲基化酶接近(Wright et al. 1992)。人们利用这种接近性,在体内从染色体上切下单个的端粒(Sandell & Zakian 1993),还可以从全部染色体中释放出端体,用于生物化学分析(Conrad et al. 1990; Wright et al. 1992; Wright & Zakian 1995)。例如,可以构建这样的线性质粒:质粒的每个末端具有高敏区域,里面含有两个 *Bam* HI 识别位点(Conrad et al. 1990; Wright et al. 1992; Wright & Zakian 1995)。取含有这种质粒菌株的核,用 *Bam* HI, 4°C 消化 10min, 80% 的端粒 DNA 会以可溶性的蛋白质-DNA 复合物形式被释放出来。如果正如一些 TPE 模型所预测的,端粒紧密地与核外周或其他别的核亚结构相结合,那么这么高的溶解度是非常令人惊奇的(Palladino et al. 1993; Stavenhagen & Zakian 1994; Dernburg et al. 本书)。

$C_{1-3}A/TG_{1-3}$ DNA 的非核小体染色质结构表明,非组蛋白与这种 DNA 在体内发生连接。第一个端粒结合蛋白是通过体外与 $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ DNA 相结合,然后在凝胶迁移测定中被检测到的。这一活性蛋白后来被证明是一种丰富的蛋白质,分子质量约为 120kDa (Shore & Nasmyth 1987),由 *RAP1* 基因编码(Buchman et al. 1988b; Longtine et al. 1989)。(Rap1p 的生物化学特性在本章中由 Fang 和 Cech 讨论。)

在 $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ DNA 中每隔约 35bp (每个端粒中约 10 次) 就会发现 Rap1p 与一段

5'- $\begin{matrix} AA \\ GC \end{matrix}$ ACCCANNCA $\begin{matrix} CC \\ TT \end{matrix}$ -3' 共有序列相结合(Buchman et al. 1988b; Wang & Zakian 1990a)。然而 Rap1p 在体外与端粒克隆结合的实际密度要高于从共有序列结合位点数目预测的结果,在与共有序列相同或接近相同的序列上每隔 18 bp 就有一个结合点(Gilson et al. 1993)。如果 Rap1p 与端粒的结合在体内与体外的效率相同,那么在细胞内 5000 个 Rap1p 分子就会有 500 个分子(Buchman et al. 1988b)在端粒上。在体外,假如它们含有

多个 Rap1p 结合位点, Rap1p 也能与 $TG_{1\sim3}$ 单链寡核苷酸结合。然而, 与 $TG_{1\sim3}$ 的结合比与 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ 的结合弱了很多, 因为 $TG_{1\sim3}$ 的摩尔数过剩 1000 倍也不与双链端粒 DNA 竞争结合 Rap1p。

在体外, Rap1p 还与端粒以外的其他位点结合。这些体外结合位点包括涉及到 *HM* 基因座转录沉默的位点 (Shore & Nasmyth 1987; Buchman et al. 1988b)、很多基因转录激活的重要位点 (Huet & sentenac 1987; Vignais et al. 1987; Hurd & Roberts 1989)、或者是促进减数分裂重组的位点 (White et al. 1991)。通过查寻 EMBL 及 Gen Bank DNA 数据库, 发现在基因启动子中有 102 个 Rap1p 的潜在结合位点 (Graham & Chambers 1994)。在 100~200 个 25S 核蛋白体的 RNA 基因上每个都有一个潜在的 Rap1 结合位点 (Buchman et al. 1988a)。在体内, 至少有一些这样的潜在非端粒 Rap1p 结合位点是真正的结合位点 (Kimmerly et al. 1988; Brindle et al. 1990; McNeil et al. 1990; Devlin et al. 1991; Giesman et al. 1991; Kurtz & Shore 1991; Moehle & Hinnebusch 1991; Sussel & Shore 1991; White et al. 1991; Klein & Struhl 1994)。另外, Rap1p 在核内可能起着重要的结构作用, 因为它把核支架分成几部分 (Hoffman et al. 1989)。

有些证据表明, 在体内 Rap1p 与端粒相互作用。例如 Rap1p 抗体特异性地与端体有免疫沉淀反应, 后者是由线性质粒 (Conrad et al. 1990) 和染色体 (Wright et al. 1992) 经核酸酶消化得来的, 并位于减数分裂染色体的末端 (Klein et al. 1992)。另外, *RAP1* 的突变和过度表达都会影响端粒的长度 (Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990; Sussel & Shore 1991; Kyrion et al. 1992)。Rap1p 结合活性降低的细胞中, 端粒越来越短 (Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990), 而在带有更多 Rap1p 的细胞中, 端粒会越来越长 (Conrad et al. 1990), 看来 Rap1p 可以保护端粒 DNA 免受降解。假设端粒是维持染色体稳定性所必需的 (Sandell & Zakian 1993), 那么这种多功能蛋白质的最基本功能可以这样解释: 保护染色体末端免受降解。最后, 至少在部分程度上, Rap1p 也是 TPE 和 CBS 所必需的, 因为与 Rap1p 羧基端作用的蛋白质对于转录沉默非常重要 (Kyrion et al. 1993; Liu et al. 1994; Wiley & Zakian 1995)。

Rap1p 很可能是体内的主要端粒结合蛋白。当真正的端粒 DNA 与大肠杆菌产生的 Rap1p 混合时, 在体外的凝胶中移动速度与染色体释放出的端粒移动的速度相同 (Wright & Zakian 1995)。然而, 现在还有遗传学和生物化学的迹象表明, 其他的结构蛋白质在体内可以与端粒发生反应。例如, *RIF1* 基因可以通过它与 Rap1p 羧基末端发生相互作用的双杂交筛选中被鉴定出来 (Hardy et al. 1992)。缺乏 219kDa Rap1p 菌株的端粒比野生型端粒长 200~300bp (Hardy et al. 1992)。遗传学证据表明, 还有其他蛋白质能与 Rap1p 羧基末端反应, 可以影响 TPE 和(或)端粒长度 (Wiley & Zakian 1995)。

在有纤毛原生动物尖毛虫中, 每个巨核 DNA 分子的两个末端都有一个 16 碱基的 $T_4G_4T_4G_4$ 单链尾 (Fang & Cech 本书)。这个单链尾是两个端粒结合蛋白质结合所必需的 (Gottschling & Zakian 1986)。这样, 与 Rap1p 不同, 尖毛虫端粒结合蛋白在体内很可能只与端粒结合。遗传学证据表明, 在酵母中可能还有一个末端结合蛋白。在将 35~50 个碱基的线状质粒引入酵母中时, TPE 几乎全部被消除 (Wiley & Zakian 1995)。与之相反, 在环状质粒的内部加入更大数量的 $C_{1\sim3}A/TG_{1\sim3}$ DNA 片段, 不会使 TPE 下降。这些数据表明, 有一种对 TPE 很重要的限制性因子, 它与 DNA 末端的亲合性高于它与内部的

C_{1~3}A/TG_{1~3}DNA 的亲合力。由于 Rap1p 在体外结合实验中,未表现出对末端比对内部 C_{1~3}A/TG_{1~3}DNA 有更强的结合力(Berman et al. 1986),所以末端结合蛋白不可能是 Rap1p。

由于尖毛虫末端结合蛋白结合 DNA 时要求一条单链的 T₄G₄T₄G₄ 尾,因此酵母末端结合蛋白可能与单链 TG_{1~3}DNA 结合。当然,在体外可以用凝胶移动试验的方法来证明酵母含有一种主要的和几种次要的蛋白质,可以与单链 TG_{1~3}DNA 结合(Lin & Zakian 1994)。没有一种蛋白质是 Rap1p,因为没有一种蛋白质被双链 C_{1~3}A/TG_{1~3}DNA 竞争。通过用标记的 TG_{1~3}寡核苷酸作探针来筛选 λ gt11 酵母表达文库,已经确定出三个编码 TG_{1~3}结合蛋白的基因,但没有发现编码主要结合蛋白的基因。这些基因中任何一种缺失或过度表达或全部缺失都不影响端粒的长度或 TPE(Lin & Zakian 1994)。然而 GBP2 的缺失会引起 RAP1 核外周定位的丧失(Konkel et al. 1995)。TBF1 是编码 63kDa 蛋白质的必需基因,可以与脊椎动物和酵母端粒序列在体外结合(Liu & Tye 1991),它的突变不会产生可检出的端粒表型(Brigate et al. 1993)。

TPE 的一种模型认为,端体起始于一种特殊的染色质结构,然后在内部增殖(Renauld et al. 1993)。在这种模型中,这些变化的核小体降低了基础转录体系与端粒邻近基因的接近能力。相对于基因组其他大部分区域的核小体来说,端粒相邻区域的核小体不能被 DNA *dam* 甲基化酶甲基化(Gottschling 1992)和低乙酰化(Braunstein et al. 1993),这些事实都支持了这个模型。另外,端粒可能被隔离到核内一个区域,该区的转录降低。为了证明这一观点,人们进行了原位杂交(T. Laroche & S. Gasser 个人通讯)和免疫定位实验(Palladino et al. 1993),结果表明,端粒和 TPE 必需的蛋白质,如 Rap1p、Sir3p 和 Sir4p 均位于核外周附近的一些数量有限的分立的位点上。另外,SIR3、SIR4 的突变可以破坏 Rap1p 位点,同时也能消除 TPE(Palladino et al. 1993)。然而,缺失 GBP2(为染色体 III 上的一可读框,在体外编码一种与 TG_{1~3}DNA 结合的蛋白质)并不能降低 TPE(Lin & Zakian 1994),但的确改变了 Rap1p 的定位(Konkel et al. 1995)。这样,在不消除 TPE 的情况下,可以发生 Rap1p 定位的丢失。另外,无论是染色质结构的改变还是核外周端粒的聚集都会影响 TPE,但不能降低染色体的稳定性(Sandell et al. 1994)。

端粒复制

密度转移(density-transfer)实验揭示出 Y' 元件以及端粒附近单一 DNA(McCarroll & Fangman 1988; Reynolds et al. 1989)和线状质粒(Wellinger et al. 1993a)在 S 期复制得较晚。在染色体 V 的右臂上,这一较晚复制的区域延续到距端粒 67kb 处(Ferguson et al. 1991)。对于染色体 V-R(Ferguson et al. 1991)和线状质粒(Wellinger et al. 1993a)来说,复制较晚可以通过端粒相邻 DNA 中的 ARS 的晚期活化来实现。相反,在染色体 III-L 上,处于端粒相邻区域内的 ARS 很少或不能成为活化的复制原点。端粒附近 DNA 的较晚复制反映了复制叉从染色体内部的一个活化的复制原点移动所需的时间(Reynolds et al. 1989; Dubey et al. 1991; Zhu et al. 1992)。

当临近端粒的 ARS 在 S 期晚期活化时,较晚的复制是接近端粒的结果(Ferguson &

Fangman 1992; Wellinger et al. 1993a)。假如通常位于端粒附近的复制原点移至环状的 YAC, YAC 则在 S 期的早期复制, 这一结果可以由密度转移实验所证明。然而, 如果 YAC 由环状转为线状, 它又会再次在 S 期的晚期复制 (Ferguson & Fangman 1992)。双向凝胶电泳表明, 当环状质粒上在 S 期早期具有正常活性的复制原点, 且移动到靠近端粒时, 在 S 期晚期才能发挥作用 (Wellinger et al. 1993a)。所以, 酵母端粒可以对附近复制原点的活化时间产生一个位置效应。很有可能端粒对复制时间的效应和对附近基因的转录状态的影响是一致的。与这种可能性一致的是, 如果额外的端粒引入到线性质粒上, 含有此种质粒的细胞表现出明显降低的 TPE (Wiley & Zakian 1995) 和更早期的 Y' 复制 (Wellinger et al. 1993c)。

尽管亚端粒 DNA 的复制时间受到附近端粒的影响, 但是它仍按照传统的复制叉进行复制 (Ferguson et al. 1991; Wellinger et al. 1993a, 1993b)。然而, 已知传统的 DNA 聚合酶在新复制的线状 DNA 分子 5' 端会留下一段空缺, 如所有线状 DNA 分子那样, 酵母染色体的末端复制必定采取一种特殊的复制机制, 以避免 DNA 缓慢的丢失 (Greider 本书)。实际上非变性的 DNA 印迹杂交实验表明, 携带 X 和 Y' 的端粒末端限制片段在 S 期晚期将得到单链 TG₁₋₃ 尾 (Wellinger et al. 1993b)。因为这种杂交方法只能检测出单链的、长度大于 30 碱基的片段, 所以这些 TG₁₋₃ 的尾太长, 不是通常预料的 8~12 个碱基尾部, 而是除去末端 RNA 引物后留下的部分。最有可能的是, 瞬时的 TG₁₋₃ 尾为 TG₁₋₃ 片段在端粒酶的作用下所产生的延伸。另外 TG₁₋₃ 尾还可以通过丢失 C₁₋₃A 链的方式形成, 例如, 在复制叉接近 DNA 分子末端时, 通过分开的前导链和后随链的合成产生。如果 C 链丢失模型是正确的, 那么 TG₁₋₃ 尾自身可以作为端粒酶介导合成的底物。端粒酶的活性最近已经在体外的酿酒酵母无细胞体系中确定出来了 (Lin & Zakian 1995)。

非变性 DNA 印迹杂交还可以用来检测线性质粒末端的 TG₁₋₃ 尾 (Wellinger et al. 1993b)。这些质粒 TG₁₋₃ 尾通过两个端粒间的相互作用, 引起质粒分子的环化 (Wellinger et al. 1993b)。这些因端粒间相互作用所形成的环是很稳定的, 但是与传统的缺刻环相比, 具有更多的单链特性, 这表明它们是通过非 Watson-Crick 碱基对结合在一起的 (Wellinger et al. 1993b)。利用环形成来监测 TG₁₋₃ 尾的密度转移实验, 揭示出这种尾的获得仅发生在一般复制叉到达线状质粒的末端以后, 或者非常接近末端时 (Wellinger et al. 1993a)。在细胞下一次循环之前, TG₁₋₃ 尾支持的端粒-端粒相互作用被解体, TG₁₋₃ 尾被剪接成双链 DNA (Wellinger et al. 1993a, 1993b)。一种可能性是 TG₁₋₃ 尾或它们之间的相互作用提供了 S 期已经结束的信号, 来作为细胞周期继续的一个关卡。

TG₁₋₃ 尾产生的机制是什么? 在体内转化实验中, 端粒的形成要求与端粒复制的端粒酶机制是一致的。与体外四膜虫端粒酶相似 (Greider & Blackburn 1985, 1987), 酵母端粒酶复制体系能识别不同的端粒 DNA, 把它们作为加入端粒 DNA 的合适底物, 例如四膜虫 C₄A₂/T₂G₄ 重复序列 (Szostak & Blackburn 1982; Dani & Zakian 1983)、尖毛虫 C₄A₄/T₄G₄ 重复序列 (Pluta et al. 1984)、脊椎动物的 C₃TA₂/T₂AG₃ 重复序列 (Brown 1989; Cross et al. 1989; Riethman et al. 1989)。尽管酵母可利用外源性 DNA 作为底物复制端粒, 但在体内仍加入非外源序列——酵母 C₁₋₃A/TG₁₋₃ 重复序列 (Walmsley et al. 1983; Pluta et al. 1984; Shampay et al. 1984; Wang & Zakian 1990b), 这又和四膜虫端粒酶在体外的作用相一致 (Greider & Blackburn 1985)。功能克隆试验发现, 约为 20bp 的克隆端

粒 DNA 可作为端粒加入的合适底物。较短的底物(Pluta & Zakian 1989)或者是在体内的方向相反的底物(Murray et al. 1988; Pluta & Zakian 1989),在转化试验中功能都不能达到可以检测的水平。端粒 DNA 的体内修饰,如 C 链缺刻或 G 链尾,都不为酵母端粒复制体系识别所必需(Murray et al. 1988; Pluta & Zakian 1989)。

在体内,断裂染色体可以获得新的端粒(Kramer & Haber 1993; Sandell & Zakian 1993),这个过程常被称为染色体愈合。在酵母中,大多数的愈合发生在与完整同源染色体间的重组修复中(Kramer & Haber 1993; Sandell & Zakian 1993)。在染色体 VII 的野生型双体细胞中,重组修复有较高的效率,比如约 70%~90%的断裂染色体 VII 可以从完整染色体 VII 通过基因转换得以修复(Sandell & Zakian 1993)。由于断裂染色体的愈合在 *rad52Δ* 株中大为降低,所以说这些修复大多数是由 *RAD52* 所介导。在 *rad52Δ* 株中,只有 0.3%的断裂染色体得到愈合,而且其中大多数(80%)是通过 *RAD52* 非依赖性同源重组实现的。然而,*rad52Δ* 中 20%的愈合是经重新合成端粒实现的,在这种情况下,新端粒加入之前,在断裂位点有 300bp 到 200kbp 的 DNA 内部序列发生丢失(L. L. Sandell et al. 待发表)。

已经确认出两种条件可以影响断裂染色体中重新加入新的端粒。PIF1 是一种 5'到 3'的 DNA 解旋酶,除去这种酶(Lahaye et al. 1991),会将向断裂染色体或 YAC 加入端粒的频率增加 200~1000 倍(Schulz & Zakian 1994; L. L. Sandell et al. 待发表)。这些数据表明,在野生型细胞内,Pif1p 抑制这种情况的发生。另外,如果染色体断裂处的内侧存在端粒 DNA 的片段,也会明显增加新端粒的加入(Kramer & Haber 1993)。同样,如果底物含有较长的端粒样 DNA 片段,在转化中重新加入端粒的效率就会增加(Pluta & Zakian 1989),这与体外四膜虫端粒酶作用一样(Harrington & Greider 1991)。

对加入新端粒的染色体断裂区域进行测序,发现新加入端粒的位置在富含 G 和(或)富含 T 的 DNA 短链上(Kramer & Haber 1993; L. L. Sandell et al. 待发表)。测定新的端粒发现,首先被加入的端粒 DNA 序列常是一个 11bp 的序列 GTGTGGGTGTG,这一序列可能被酵母端粒酶 RNA 所编码(Kramer & Haber 1993)。的确,当对端粒酶 RNA 基因克隆并测序以后,发现在 16bp 端粒样序列中含有这一序列的互补序列(Singer & Gottschling 1994; Greider 本书)。这一区域作为端粒 DNA 的模板,是通过改变该序列并且改变的序列在体内可以掺入到端粒 DNA 上所证明的(Singer & Gottschling 1994)。

TLC1 是编码端粒酶 RNA 的基因,它是通过特殊的方法测定出来的(Singer & Gottschling 1994)。该基因的 cDNA 已经被分离出来,它的过度表达可以引起 TPE 的丧失。总共发现 10 种不同的基因,其中之一是 *TLC1*。*TLC1* 的一部分过度表达会引起端粒长度的下降,也会引起 TPE 的降低。消除 *TLC1* 则引起端粒的缩短,且以每次细胞分裂少 3bp 的速度进行。端粒的缩短与高水平的细胞死亡有关。所以,*tlc1Δ* 细胞的表型与 *est1Δ* 细胞的表型非常相似。与编码分子质量约为 77kDa 的蛋白质的 *EST1* 基因不同(Lundblad & Szostak 1989),*TLC1* 不具有明显的可读框,但是含有如上所述的 16bp 片段,可以作为合成端粒 DNA 的模板。这个基因编码丰度相对高的端粒酶 RNA,长度为 1300 个碱基(Singer & Gottschling 1994),比纤毛原生动物的 160~200bp 的端粒酶 RNA 长很多(Greider 本书),但与乳酸克鲁维酵母端粒酶的 RNA 大小相同(McEachern & Blackburn 1995)。

除 *EST1* 和 *TLC1* 以外,至少还有三个基因,在发生突变时会产生一种 *est1* 样的表型 (V. Lundblad 个人通讯)。进而,很有可能存在有一些蛋白质,影响着端粒酶的特异性和效率。例如,非必需基因 *PIF1* 的突变对端粒有三种影响 (Schulz & Zakian 1994)。第一,在 *pif1* 细胞中的所有端粒,与野生型细胞相比都比较长,表明 Pif1p 解旋酶以某种方式限制了现有端粒的复制。第二,在自发或诱导断裂的染色体中,*PIF1* 的突变明显提高了新端粒加入的速度,同时也说明 Pif1p 解旋酶通常抑制端粒的加入。第三,*PIF1* 突变改变了新加入端粒的特异性,以至于在野生型细胞中很少或不用的位点,在 *pif1* 细胞中也能够被有效的使用。一种解释这种结果的模型是,Pif1p 解旋酶起到从 DNA 底物上除去端粒酶 RNA 的作用:通过这种模型,Pif1p 在维持端粒复制的过程中,将会减缓端粒酶的进行性,在加入新端粒时提高端粒酶活性的特异性。

端粒酶加入重复序列可能只是维持酵母端粒途径中的一种。随着端粒的缩短,*est1Δ* 或 *tlc1Δ* 株的大多数细胞将会死亡。然而,在这两种菌株中,一小部分细胞将继续分裂 (Lundblad & Blackburn 1993; Singer & Gottschling 1994)。已经有人对 *est1Δ* 存活的细胞进行深入研究 (Lundblad & Blackburn 1993)。大多数的存活细胞比起始株有更多的 Y' DNA, Y' 可以占整个细胞 DNA 的 10%。在这样的细胞中,大部分的染色体末端,甚至那些原来缺乏 Y' 的末端,也带有一个 Y' 或者 Y' 的删简版本。Y' DNA 的分布具有动力学特点,随着细胞的生长,端粒可以获得或丢失 Y' 元件。由于存活细胞不出现于 *rad52Δ* 株内, Y' 移动很可能是由同源重组产生,而不是由转座造成的。然而酵母中端粒的维持,在没有端粒酶情况下,同果蝇正常维持端粒的途径相似,后者包括了向染色体末端移动的可转座元件 (Pardue 本书)。

还有第三个途径,从理论上说可以维持酵母端粒。当两端带有两个不同外源端粒序列的线状质粒通过转化引入到酵母中时,外源端粒重复序列经常由质粒的一端移到另一端,该过程无需 *RAD52* (Pluta & Zakian 1989)。线性质粒的结构说明,该移动过程发生在 $C_1\sim_3A/TG_1\sim_3$ 重复序列加入之前, $C_1\sim_3A/TG_1\sim_3$ 重复序列可以加入到外源端粒 DNA 的两端,成为功能性的酵母端粒。端粒酶机制可以解释 $C_1\sim_3A/TG_1\sim_3$ 重复序列的加入,但是不能解释外源序列从端粒一端移向另一端。所以,这种转移可能由重组引起。另一个解释是 Pif1p 影响端粒长度和新端粒的加入,并抑制了端粒和端粒的重组。

展望

非整倍性和染色体异常是人体细胞衰老和癌变的特征。另外,人端粒的长度在衰老和癌变时有所变化 (Harley 本书; de Lange 本书)。人细胞无论在体内还是在体外,端粒都会随着衰老变得越来越短,这个过程可能是由于体细胞内缺少端粒酶的原因所致。可以通过抑制编码端粒酶组分的基因的表达或增加端粒酶抑制因子的表达,或者同时采用两种方式,使端粒酶的活性下降。与此不同,几乎在所有的肿瘤细胞中,都发现有端粒酶的活性,总是伴有端粒长度的稳定或增加。在酵母中的研究表明,与衰老和癌症有关的遗传的不稳定性至少可以在一定的程度上用端粒 DNA 的变化来解释。

端粒 DNA 的丢失对酵母细胞的影响可能有几种方式。即使是单一染色体上的端粒 DNA 丢失也会引起细胞周期的停止 (Sandell & Zakian 1993)。然而,如果断裂的染色体

没得到新的端粒,细胞最终还会从停止状态恢复过来。复制并分离缺乏端粒的染色体需要进行4~10或更多次的细胞分裂。根据McClintock的实验结果,不带端粒的染色体易于与其他断裂末端发生融合,于是启动了断裂-融合-桥循环,引起更大的染色体不稳定性。在酵母中,缺乏端粒的染色体最终将要丢失或被修复(Sandell & Zakian 1993)。对于完整的染色体和非整倍体细胞来说,丢失染色体将导致杂合性的丢失。通过重组或加入新的端粒可以修复断裂的染色体,这能够引起杂合性的部分丢失。假如加入新的端粒,加入新端粒位置的远端全部序列的非整倍性也将部分丢失。在大部分肿瘤中,含有肿瘤抑制基因的染色体区会出现功能性的纯合。利用酵母作为例子,很容易想像,杂合性的丢失会在端粒长度下降时加快。另外,当酵母端粒复制遇到障碍时,例如丢失*EST1*功能,带有重组介导的Y'DNA扩增的细胞可能具有选择的优势。尽管这些细胞在短时间内不发生死亡(其中的大部分*est1*细胞必定要死亡),但Y'扩增的过程,在端粒附近区域产生了很大程度上的不稳定性(Lundblad & Blackburn 1993)。

端粒复制的障碍可能影响基因的表达和染色体的稳定。酵母端粒附近基因的转录受到抑制(Gottschling et al. 1990)和复制延迟(Ferguson & Fangman 1992)。由内部端粒DNA片段介导的转录抑制还能在远离端粒的位点上发生(Stavenhagen & Zakian 1994)。尽管端粒对转录的位置效应在脊椎动物上没有记录,但已经见于其发生在膨贝裂殖酵母(Nimmo et al. 1994)和果蝇中(Levis et al. 1985; Karpen & Spradling 1992)。如果说端粒结构与功能具有保守性,那么TPE和CBS现象广泛存在于真核细胞之中也不足为怪了。人们一直认为,人细胞内端粒DNA的缺失可能改变端粒附近基因表达的模式。随着衰老端粒DNA丢失的增多,使得它们对转录抑制的敏感性加强(Wright & Shay 1992)。另外,随着端粒的变短,内部的端粒DNA片段可能与反式作用因子的竞争作用加强,如哺乳动物与Rap1p相对应的因子,是转录沉默所必需的因子。这样,在端粒比较短的细胞内,位于内部端粒序列片段附近的基因可能受到的抑制作用更加明显。

从单细胞生物如酵母等,到高等的植物和动物,端粒的结构和功能具有高度的保守性。在酵母的研究中已经揭示出有相当多的基因影响端粒的结构和功能。在这些遗传上有较高适应性的生物体内,人们还在进一步研究有关酵母端粒复制和功能有关的机制,寻找着人类遗传疾病发生中破坏这些过程的线索。

致谢

我感谢那些为我寄来研究资料复印件或未发表文稿的同行们。我还感谢我们研究室的Jeff Mangahas和Jing-Jer Lin为我制作了图5-2和图5-3。我室的研究得到了国家卫生部GM-26938和GM-43265的资助。

参考文献

- Aparicio, O.M., B.L. Billington, and D.E. Gottschling. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66: 1279-1287.
- Berman, J., C.Y. Tachibana, and B.-K. Tye. 1986. Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 3713-3717.
- Blackburn, E.H. and J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120: 33-53.
- Boswell, R.E., L.A. Klobutcher, and D.M. Prescott. 1982. Inverted terminal repeats are added to genes during macronuclear development in *Oxytricha nova*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3255-3259.
- Braunstein, M., A.B. Rose, S.G. Holmes, C.D. Allis, and J.R. Broach. 1993. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* 7: 592-604.
- Brewer, B.J., D. Lockshon, and W.L. Fangman. 1992. The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* 71: 267-277.
- Brigate, C., S. Kurtz, D. Balderes, G. Vidali, and D. Shore. 1993. An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1306-1314.
- Brindle, P.K., J.P. Holland, C.E. Willett, M.A. Innis, and M.J. Holland. 1990. Multiple factors bind the upstream activation sites of the yeast enolase genes *ENO1* and *ENO2*: ABF1 protein, like repressor activator protein RAP1, binds cis-acting sequences which modulate repression or activation of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4872-4885.
- Brown, W.R.A. 1989. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* 338: 774-776.
- Buchman, A.R., N.F. Lue, and R.D. Kornberg. 1988a. Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5086-5099.
- Buchman, A.R., W.J. Kimmerly, J. Rine, and R.D. Kornberg. 1988b. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 210-225.
- Campbell, J.L. 1993. Yeast DNA replication. *J. Biol. Chem.* 268: 25261-25264.
- Campbell, J.L. and C.S. Newlon. 1991. Chromosomal DNA replication. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics* (ed. J.R. Broach et al.), p.41. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Carle, G.F. and M.V. Olson. 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 3756-3760.
- Carlson, M., J.L. Celenza, and F.J. Eng. 1985. Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2894-2902.
- Carson, M.J. and L. Hartwell. 1985. *CDC 17*: An essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell* 42: 249-257.
- Chambers, A., J.S.H. Tsang, C. Stanway, A.J. Kingsman, and S.M. Kingsman. 1989. Transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* *PGK* gene by RAP1. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5516-5524.
- Chan, C.S.M. and B.-K. Tye. 1980. Autonomously replicating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6329-6333.
- . 1983a. A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replication sequences that have very similar genomic environments. *J. Mol. Biol.* 168: 505-523.
- . 1983b. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* 33: 563-573.
- Charron, M.J., E. Read, S.R. Haut, and C.A. Michels. 1989. Molecular evolution of the telomere-associated *MAL* loci of *Saccharomyces*. *Genetics* 122: 307-316.

- Conrad, M.N., J.H. Wright, A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres *in vivo*: Overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**: 739–750.
- Cross, S.H., R.C. Allshire, S.J. McKay, N.I. McGill, and H.J. Cooke. 1989. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* **338**: 771–774.
- Dani, G.M. and V.A. Zakian. 1983. Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 3406–3410.
- Devlin, C., K. Tice-Baldwin, D. Shore, and K. Arndt. 1991. RAP1 is required for BAS1/BAS2- and GCN4-dependent transcription of the yeast *HIS4* gene. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3642–3651.
- Dorsey, M., C. Peterson, K. Bray, and C.E. Paquin. 1992. Spontaneous amplification of the *ADH4* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **132**: 943–950.
- Dubey, D.D., L.R. Davis, S.A. Greenfeder, L.Y. Ong, J. Zhu, J.R. Broach, C.S. Newlon, and J.A. Huberman. 1991. Evidence suggesting that the *ARS* elements associated with silencers of the yeast mating-type locus *HML* do not function as chromosomal DNA replication origins. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5346–5355.
- Dujon, B., D. Alexandraki, B. Andre, W. Ansorge, V. Baladron, J.P.G. Ballesta, A. Banrevi, P.A. Bolle, M. Bolotin-Fukuhara, P. Bossier, G. Bou, J. Boyer, M.J. Bultrago, G. Cheret, L. Colleaux, B. Dagnan-Fornier, F. del Rey, C. Dion, H. Domdey, A. Dusterhoft, S. Dusterhus, K.-D. Entian, H. Erfle, P.F. Esteban, H. Feldmann, et al. 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* **369**: 371–378.
- Elledge, S.J. and R.W. Davis. 1989. Identification of the DNA damage-responsive element of *RNR2* and evidence that four distinct cellular factors bind it. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5373–5386.
- Ferguson, B. and W.L. Fangman. 1992. A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* **68**: 333–339.
- Ferguson, B.M., B.J. Brewer, A.E. Reynolds, and W.L. Fangman. 1991. A yeast origin of replication is activated late in S phase. *Cell* **65**: 507–515.
- Giesman, D., L. Best, and K. Tatchell. 1991. The role of RAP1 in the regulation of the *MAT α* locus. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1069–1079.
- Gilson, E., M. Roberge, R. Giraldo, D. Rhodes, and S.M. Gasser. 1993. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J. Mol. Biol.* **231**: 293–310.
- Giraldo, R. and D. Rhodes. 1994. The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA. *EMBO J.* **13**: 2411–2420.
- Giraldo, R., M. Suzuki, L. Chapman, and D. Rhodes. 1994. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: A circular dichroism study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 7658–7662.
- Gottschling, D.E. 1992. Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 4062–4065.
- Gottschling, D.E. and V.A. Zakian. 1986. Telomere proteins: Specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* **47**: 195–205.
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, and V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**: 751–762.
- Graham, I.R. and A. Chambers. 1994. Use of a selection technique to identify the diversity of binding sites for the yeast RAP1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **22**: 124–130.
- Greider, C.W. and E.H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**: 405–413.
- . 1987. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**: 887–898.

- Hardy, C.F.J., L. Sussel, and D. Shore. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6: 801-814.
- Harrington, L.A. and C.W. Greider. 1991. Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* 353: 451-454.
- Hoffman, J.F.-X., T. Laroche, A.H. Brand, and S.M. Gasser. 1989. RAP-1 factor is necessary for DNA loop formation in vitro at the silent mating type locus *HML*. *Cell* 57: 725-737.
- Horowitz, H., P. Thorburn, and J.E. Haber. 1984. Rearrangements of highly polymorphic regions near telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2509-2517.
- Huet, J. and A. Sentenac. 1987. TUF, the yeast DNA-binding factor specific for UAS_{mpg} upstream activating sequences: Identification of the protein and its DNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 3648-3652.
- Hurd, H.K. and J.W. Roberts. 1989. Upstream regulatory sequences of the yeast *RNR2* gene include a repression sequence and an activation site that binds the RAP1 protein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5359-5372.
- Jaeger, D. and P. Philippsen. 1989. Many yeast chromosomes lack the telomere specific Y' sequence. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5754-5757.
- Johnson, L.M., M. Snyder, L.M. Chang, R.W. Davis, and J.L. Campbell. 1985. Isolation of the gene encoding yeast DNA polymerase I. *Cell* 43: 369-377.
- Karpen, G.H. and A.C. Spradling. 1992. Analysis of subtelomeric heterochromatin in the *Drosophila* minichromosome *Dp1187* by single P element insertional mutagenesis. *Genetics* 132: 737-753.
- Kimmerly, W., A. Buchman, R. Kornberg, and J. Rine. 1988. Roles of two DNA-binding factors in replication, segregation and transcriptional repression mediated by a yeast silencer. *EMBO J.* 7: 2241-2253.
- Klein, C. and K. Struhl. 1994. Protein kinase A mediates growth-regulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1 transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1920-1928.
- Klein, F., T. Laroche, M.E. Cardenas, J.F.-X. Hofmann, D. Schweizer, and S.M. Gasser. 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J. Cell Biol.* 117: 935-948.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3015-3019.
- Konkel, L.M.C., S. Enomoto, E. Chamberlain, P. McCune-Zierath, S.J.P. Iyadurai, and J. Berman. 1995. A class of single-stranded telomeric DNA-binding proteins required for Rap1p localization of yeast nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press).
- Kouprina, N., E. Kroll, A. Kirillov, B. Banniklv, V. Zakharyev, and V. Larionov. 1994. *CHL12*, a gene essential for the fidelity of chromosome transmission in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 138: 1067-1079.
- Kramer, K.M. and J.E. Haber. 1993. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG₁₋₃ repeats. *Genes Dev.* 7: 2345-2356.
- Kurtz, S. and D. Shore. 1991. RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast. *Genes Dev.* 5: 616-628.
- Kyrion, G., K.A. Boakye, and A.J. Lustig. 1992. C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5159-5173.
- Kyrion, G., K. Liu, C. Liu, and A.J. Lustig. 1993. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7: 1146-1159.
- Lahaye, A., H. Stahl, D. Thines-Sempoux, and F. Foury. 1991. PIF1: A DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10: 997-1007.
- Levis, R., T. Hazelrigg, and G.M. Rubin. 1985. Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the *white* gene of *Drosophila*. *Science* 229: 558-561.
- Lin, J.J. and V.A. Zakian. 1994. Isolation and characterization of two *Saccharomyces*

- cerevisiae* genes that encode proteins that bind to $(TG_{1-3})_n$ single strand telomeric DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4906–4913.
- . 1995. An *in vitro* assay for *Saccharomyces* telomerase requires *EST1*. *Cell* (in press).
- Liu, Z.P. and B.K. Tye. 1991. A yeast protein that binds to vertebrate telomeres and conserved yeast telomeric junctions. *Genes Dev.* **5**: 49–59.
- Liu, C., X. Mao, and A.J. Lustig. 1994. Mutational analysis defines a C-terminal tail domain of RAP1 essential for telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**: 1025–1040.
- Longtine, M.S., N.M. Wilson, M.E. Petracek, and J. Berman. 1989. A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr. Genet.* **16**: 225–239.
- Louis, E.J. and J.E. Haber. 1990a. Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 547–559.
- . 1990b. The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: An experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* **124**: 533–545.
- . 1992. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**: 559–574.
- Louis, E.J., E.S. Naumova, A. Lee, G. Naumov, and J.E. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: Its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* **136**: 789–802.
- Lundblad, V. and E.H. Blackburn. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1*[−] senescence. *Cell* **73**: 347–360.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633–643.
- Lustig, A.J. 1992. Hoogsteen G-G base pairing is dispensable for telomere healing in yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3021–3028.
- Lustig, A.J. and T.D. Petes. 1986. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 1398–1402.
- Lustig, A.J., S. Kurtz, and D. Shore. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* **250**: 549–553.
- McCarroll, R.M. and W.L. Fangman. 1988. Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell* **54**: 505–513.
- McClintock, B. 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **25**: 405–416.
- . 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234–282.
- McEachern, M. and E.H. Blackburn. 1995. Runaway telomeres caused by telomerase RNA gene mutations in the yeast *K. lactis*. *Nature* (in press).
- McNeil, J.B., P. Dykshoorn, J.N. Huy, and S. Small. 1990. The DNA-binding protein RAP1 is required for efficient transcriptional activation of the yeast *PYK* glycolytic gene. *Curr. Genet.* **18**: 405–412.
- Moehle, C.M. and A.G. Hinnebusch. 1991. Association of RAP1 binding sites with stringent control of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2723–2735.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* **13**: 181–195, 198.
- Murray, A.W. and J.W. Szostak. 1986. Construction and behavior of circularly permuted and telocentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3166–3172.
- Murray, A.W., T.E. Claus, and J.W. Szostak. 1988. Characterization of two telomeric DNA processing reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4642–4650.
- Newlon, C.S., I. Collins, A. Dershowitz, A.M. Deshpande, S.A. Greenfeder, L.Y. Ong, and J.F. Theis. 1993. Analysis of replication origin function on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 415–423.

- Nimmo, E.R., G. Cranston, and R.C. Allshire. 1994. Telomere-associated chromosome breakage in fission yeast results in variegated expression of adjacent genes. *EMBO J.* 13: 3801-3811.
- Norris, D., B. Dunn, and M.A. Osley. 1988. The effect of histone gene deletions on chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 242: 759-761.
- Oka, Y., S. Shiota, S. Nakai, Y. Nishida, and S. Okubo. 1980. Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of *Stylonychia pustulata*. *Gene* 10: 301-306.
- Oliver, S.G., Q.J.M. van der Aart, M.L. Agostoni-Carbone, M. Aigle, L. Alberghina, D. Alexandraki, G. Antoine, R. Anwar, J.P.G. Ballesta, P. Benit, et al. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357: 38-46.
- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75: 543-555.
- Pluta, A.F. and V.A. Zakian. 1989. Recombination occurs during telomere formation in yeast. *Nature* 337: 429-433.
- Pluta, A.F., G.M. Dani, B.B. Spear, and V.A. Zakian. 1984. Elaboration of telomeres in yeast: Recognition and modification of termini from *Oxytricha* macronuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 1475-1479.
- Renauld, H., O.M. Aparicio, P.D. Zierath, B.L. Billington, S.J. Chhablani, and D.E. Gottschling. 1993. Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and SIR3 dosage. *Genes Dev.* 7: 1133-1145.
- Reynolds, A.E., R.M. McCarroll, C.S. Newlon, and W.L. Fangman. 1989. Time of replication of ARS elements along yeast chromosome III. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4488-4494.
- Riethman, H.C., R.K. Moyzis, J. Meyne, D.T. Burke, and M.V. Olson. 1989. Cloning human telomeric DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast-artificial-chromosome vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6240-6244.
- Runge, K.W. and V.A. Zakian. 1989. Introduction of extra telomeric DNA sequences into *Saccharomyces cerevisiae* results in telomere elongation. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1488-1497.
- Sandell, L.L. and V.A. Zakian. 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. *Cell* 75: 729-739.
- Sandell, L.L., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1994. Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without reducing chromosome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12061-12065.
- Schulz, V.P. and V.A. Zakian. 1994. The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* 76: 145-155.
- Sen, D. and W. Gilbert. 1988. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334: 364-366.
- Shampay, J. and E.H. Blackburn. 1988. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 534-538.
- Shampay, J., J.W. Szostak, and E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154-157.
- Shore, D. and K. Nasmyth. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51: 721-732.
- Singer, M.S. and D.E. Gottschling. 1994. TLC1, the template RNA component of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266: 387-388.
- Stavenhagen, J.B.S. and V.A. Zakian. 1994. Internal tracts of telomeric DNA act as silencers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 8: 1411-1422.
- Sussel, L. and D. Shore. 1991. Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: Isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7749-7753.
- Szostak, J.W. and E.H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vec-

- tors. *Cell* **29**: 245–255.
- Turakainen, H., G. Naumov, E. Naumova, and M. Korhola. 1993. Physical mapping of the *MEL* gene family in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **24**: 461–464.
- Venczel, E.A. and D. Sen. 1993. Parallel and antiparallel G-DNA structures from a complex telomeric sequence. *Biochemistry* **32**: 6220–6228.
- Venter, U. and W. Horz. 1989. The acid phosphatase genes *PHO10* and *PHO11* in *S. cerevisiae* are located at the telomeres of chromosomes VIII and I. *Nucleic Acids Res.* **17**: 1353–1369.
- Vignais, M.L., L.P. Woudt, G.M. Wassenaar, W.H. Mager, A. Sentenac, and R.J. Planta. 1987. Specific binding of TUF factor to upstream activation sites of yeast ribosomal protein genes. *EMBO J.* **6**: 1451–1457.
- Voytas, D.F. and J.D. Boeke. 1992. Yeast retrotransposon revealed. *Nature* **358**: 717.
- Walmsley, R.M., J.W. Szostak, and T.D. Petes. 1983. Is there left-handed DNA at the ends of yeast chromosomes? *Nature* **302**: 84–86.
- Walmsley, R.M., C.S.M. Chan, B.-K. Tye, and T.D. Petes. 1984. Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* **310**: 157–160.
- Walton, J.D., C.E. Paquin, K. Kaneko, and V.M. Williamson. 1986. Resistance to antimycin A in yeast by amplification of *ADH4* on a linear 42 kb palindromic plasmid. *Cell* **46**: 857–863.
- Wang, S.-S. and V.A. Zakian. 1990a. Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4415–4419.
- . 1990b. Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* **345**: 456–458.
- Wellinger, R.J. and V.A. Zakian. 1989. Lack of positional requirements for autonomously replicating sequence elements on artificial yeast chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 973–977.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993a. Origin activation and formation of single strand TG₁₋₃ tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4057–4065.
- . 1993b. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG₁₋₃ tails late in S phase. *Cell* **72**: 51–60.
- . 1993c. Structural and temporal analysis of telomere replication in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 725–732.
- White, M.A., M. Wierdl, P. Detloff, and T.D. Petes. 1991. DNA-binding protein RAP1 stimulates meiotic recombination at the *HIS4* locus in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9755–9759.
- Wiley, E. and V.A. Zakian. 1995. Extra telomeres, but not internal tracts of telomeric DNA, reduce transcriptional repression at *Saccharomyces* telomeres. *Genetics* **139**: 67–79.
- Wright, J.H. and V.A. Zakian. 1995. Analysis and purification of telomeric chromatin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1454–1460.
- Wright, J.H., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* **6**: 197–210.
- Wright, W.E. and J.W. Shay. 1992. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet.* **8**: 193–197.
- Zakian, V.A. and H.M. Blanton. 1988. Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2257–2260.
- Zhu, J., C.S. Newlon, and J.A. Huberman. 1992. Localization of a DNA replication origin and termination zone on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4733–4741.

第六章 酿酒酵母中端粒的位置效应和转录沉默

David Shore

Department of Microbiology

Columbia University College of Physicians & Surgeons

New York, New York 10032

“位置效应”指由于特定 DNA 序列在染色体上的位置不同而导致的基因活性、复制或重组上的差异。在对黑腹果蝇进行了几十年的遗传研究后,人们发现并鉴定了许多稳定和不稳定的“位置效应”(Henikoff 1990)。果蝇和其他真核细胞,在种系转化的过程中可以经常观察到稳定的“位置效应”,且被用来鉴定发育调节基因(Wilson et al. 1990)。由于新的染色体环境而导致基因活性的稳定改变似乎是内源性的调控元件(如组织特异性增强子)和受影响的基因启动子之间的相互作用的结果。Muller 在 1930 年首次描述了不稳定的位置效应也称花斑位置效应(position effect variegation, PEV)。该效应经常伴随着常染色质基因易位到异染色质内或其附近(Schultz 1936)。在 Muller 的研究中,他将果蝇的白眼基因易位到着丝粒附近的异染色质区域,结果在果蝇复眼中出现红白斑混合的细胞,其原因是在单个细胞中白眼基因或表达或阻抑。虽然对果蝇的花斑位置效应了解和研究了半个多世纪,但对它的分子机制还没能做出解释。PEV 现象似乎是广泛存在的,如在小鼠、昆虫、植物和酵母都观察到该现象(Limade-Faria 1983)。

果蝇白眼基因易位(w^M)的表型揭示了 PEV 的两个共有特征。首先,受影响的基因存在两种相互独立的转录状态:活化(未受影响)和阻抑状态。其次,成年组织的花斑变化在个体细胞水平上不是随机的,因为人们观察到相对较大的连续的细胞群(克隆)都表现出相同的表型。这些特性被认为是反映了染色体分成两个不同的功能区域(异染色质和常染色质)的动力学过程。依据这种观点,花斑位置效应源于在早期发育过程中异染色质从某个起始位点(或几个起始点)向受影响的常染色质基因的可变扩展。在某一点上,单个细胞的异染色质模式会“固定化”,并通过随后的细胞分裂稳定地遗传给子代细胞,这就解释了为什么在成年组织中有相同的细胞群。基于此,PEV 现象可被看作是研究控制异染色质组装的途径之一。

在酿酒酵母机体内,尽管缺少任何可见的异染色质类型,但酿酒酵母较好地显示了控制接合型基因的位置效应(Laurenson & Rine 1992)。酵母的接合型(a 型或 α 型)由染色体 III 的着丝粒附近的一个叫 MAT 的基因座决定, MAT 含有 a 或者 α 基因。另外两个基因座叫作 HML 和 HMR,分别位于染色体 III 的左右端粒附近,也含有完整的但不表达的 a 或者 α 基因拷贝(见图 6-1)。早期的研究表明,“沉默”HM 基因座不能表达的原因不是因为染色体缺乏启动子或结构基因序列,而是因为这些序列在染色体上的位置不同(Klar et al. 1981; Nasmyth et al. 1981)。HM 基因座的阻抑是一个主动过程,因为 4 个

反式作用调节因子中任何一个突变都会导致这两个位点去阻抑,这些调节因子是 *SIR* (silent information regulator) 基因的产物(Haber & George 1979; Klar et al. 1979; Rine et al. 1981; Rine & Herskowitz 1987)。随后的研究将顺式作用位点定位在两个 *HM* 基因座的两侧,这些位点对于阻抑是非常重要和必需的(Abraham et al. 1984; Feldman et al. 1984)。奇怪的是,将它们克隆到质粒上时,这 4 个位点都可以作为复制起始点[自主复制序列元件(autonomously replicating sequence element),也称 ARS 元件]。因为这些调节序列可以在远距离以非方向依赖性的方式发挥作用,阻断 pol I 和 pol II 启动子的表达(Brand et al. 1985; Schnell & Rine 1986),所以它们被称为“沉默子”元件(Brand et al. 1985)。沉默的分子机制可能涉及到染色质结构的改变,因为组蛋白 H4 高度保守的氨基端尾部的突变可以特异性地减弱或消除在两个 *HM* 基因座的阻抑作用(Kayne et al. 1988; Megee et al. 1990; Park & Szostak 1990)。

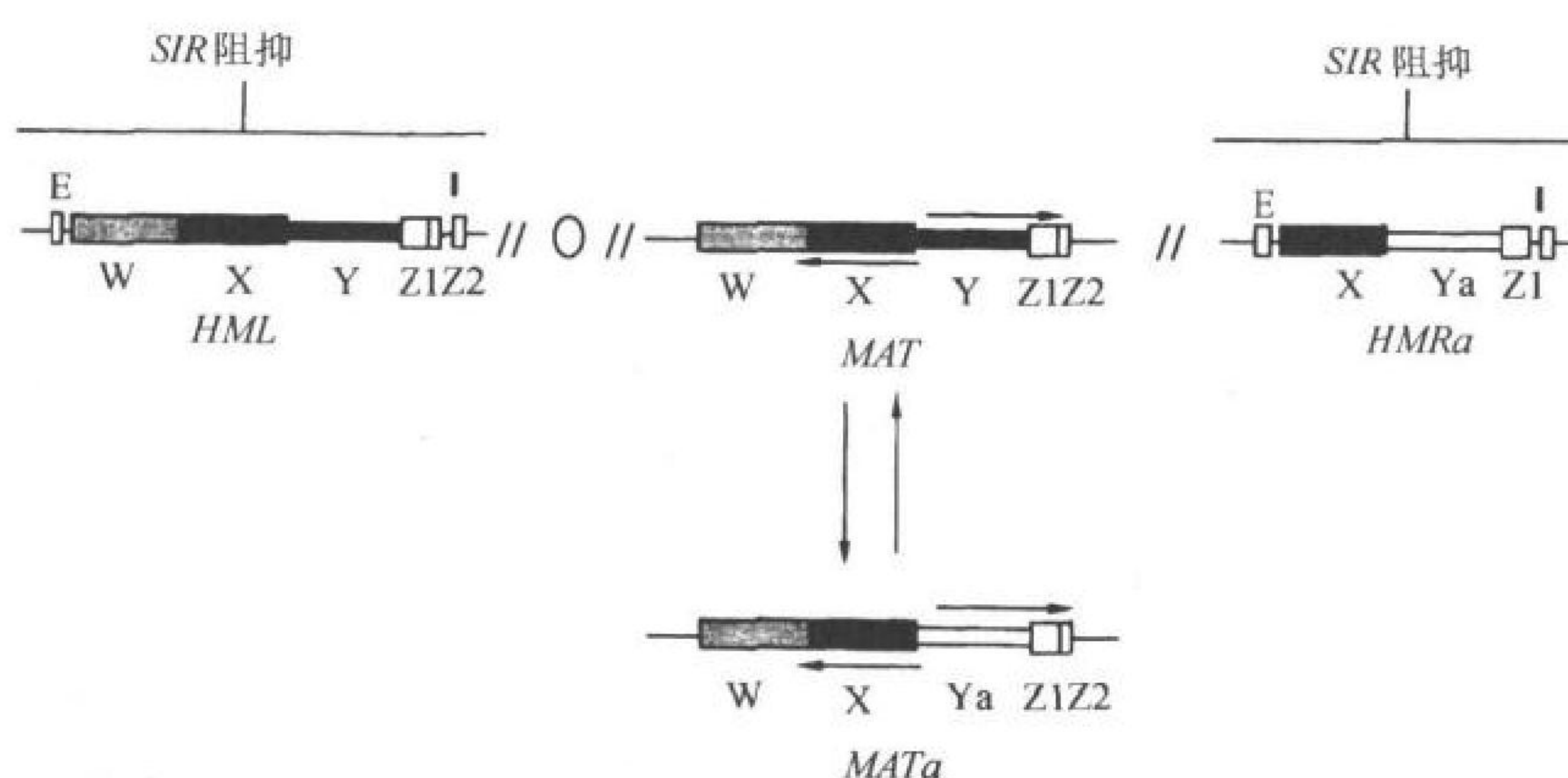


图 6-1 酿酒酵母染色体 III 上的接合型基因座示意图

所有三个基因座(*HML*、*MAT* 和 *HMR*)共享两个叫做 X(704bp)和 Z1(239bp)的同源区域。*HML* 和 *MAT* 另外还共享 W(723bp)和 Z2(88bp)区域。单一序列 Ya 和 Ya 分别为 747bp 和 624bp(Astell et al. 1981)。如图所示,位于中间的两个启动子都存在于这三个基因座上,但正常情况下只在 *MAT* 基因座表现出活性。*HML* 和 *HMR* 两侧都与沉默子元件相连(E 在左侧,I 在右侧),二者介导 *SIR* 依赖性转录阻抑,还可以阻止 *HO* 内切核酸酶在 Z1 位点切割(图中未标明)。在转录的 *MAT* 基因座没有沉默子,在该基因座也发生 *HO* 切割和接合型相互转变。*HML* 基因座位于染色体 III 左侧距离端粒约 12.3kb 处,而 *HMR* 距右侧端粒约 23kb,起始于约第 292 000 个核苷酸。*MAT* 基因座,起始于第 198 300 个核苷酸,在着丝粒右侧 85kb,距 *HMR* 约 100kb(Oliver et al. 1992)。

在研究端粒蛋白质与 DNA 相互作用的过程中,Gottschling、Zakian 及其同事发现酵母端粒附近的基因也受位置效应的影响(Cottschling et al. 1990)。与 *HM* 基因座的情况不同(此处的沉默正常情况下是稳定的),在酵母中端粒的阻抑是花斑样的,这与果蝇 PEV 相似。该发现说明酵母中的端粒与果蝇中的对等物一样,是异染色质区域,可以影响附近基因的表达活性(Hazelrigg et al. 1984; Levis et al. 1985)。后来又发现,端粒的位置效应(以后简称为 TPE)也需要组蛋白 H4 氨基端尾部和许多 *SIR* 基因,所以在机制上和接合型基因沉默有关(Aparicio et al. 1991),这一发现对理解这两个现象大有裨益。尽管对酵母 TPE 的研究仍处于初级阶段,但近来的一些报道,以及正在进行的 *HM* 机制的

研究,将使我们在分子水平上了解这种不同寻常而又普遍存在的基因调控形式。

由于接合型基因沉默和 TPE 在机制上有诸多相似性,我在本章中将它们一起讨论,尽可能对它们加以对比。首先介绍 TPE 的测量方法,并讨论它的基本特性。然后从沉默子和端粒顺式调节元件以及结合蛋白的水平开始对 TPE 和 *HM* 基因座的沉默进行深入的探讨。接着描述参与阻抑的 SIR 蛋白质和其他反式作用因子。再讨论导致这些基因座发生阻抑的端粒和沉默子的有关问题。下一节是关于 TPE 如何从染色体末端扩展及 TPE 的调节机制,最后讨论组蛋白的作用和沉默机制模型。在本章结束时我将简要地评述酿酒酵母中的其他位置效应及在裂殖酵母和多细胞真核生物中的相关现象。

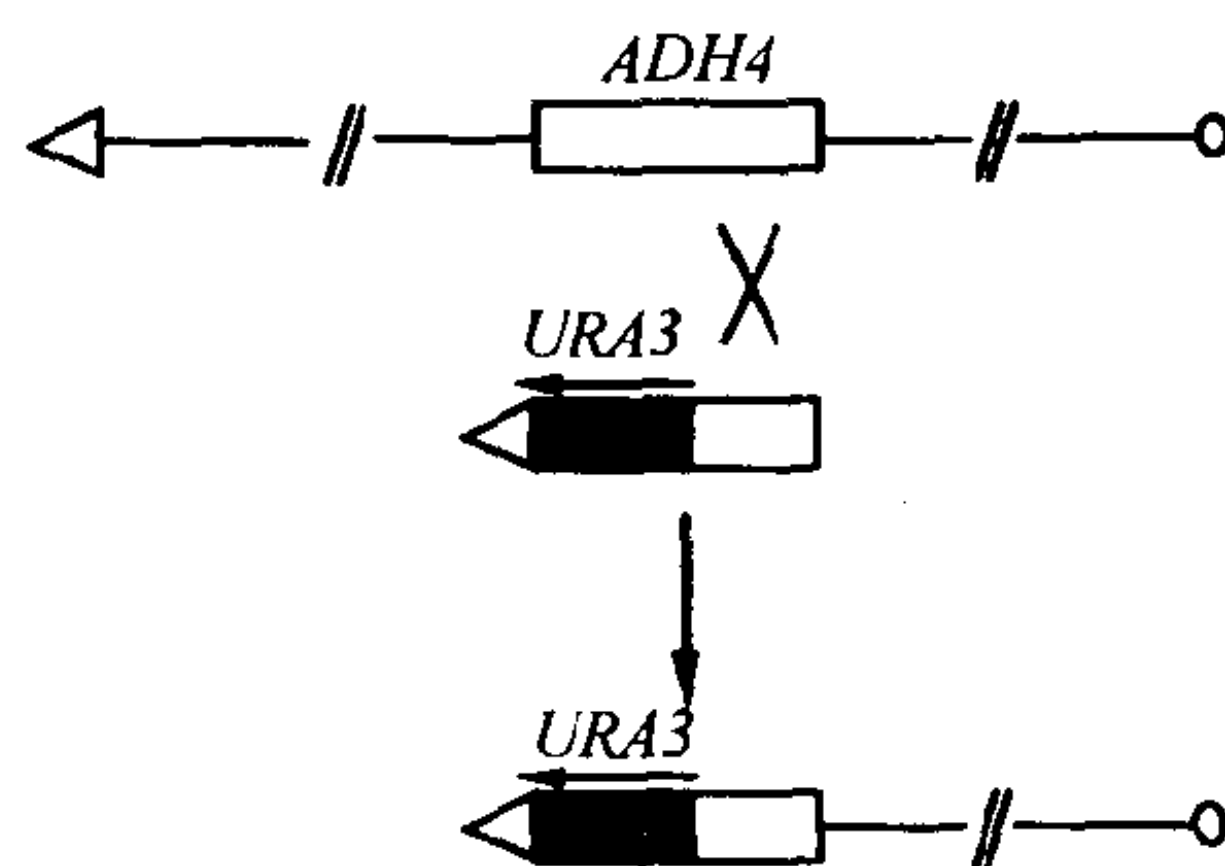
酿酒酵母的端粒沉默:一种可逆的位置效应,作用于转录并可从染色体末端不断扩展

直到人们能够用报道基因(其表达可以在单个细胞水平上监控)标记特定的端粒,酵母的 TPE 才被发现(Gottschling et al 1990)。这些初期的研究方法利用酵母转化过程中同源重组的特点,产生新的端粒(Rothstein 1991)(见图 6-2)。一种构建过程是:含有部分 *ADH4* 基因的线形 DNA 片段,与完整的 *URA3* 基因连接在一起,并以 polyC_{1~3}A 序列结尾,然后用其转化一个 *ura3⁻* 单倍体株。借助外源 DNA 上的 *ADH4* 序列和内源性的 *ADH4* 基因座(位于染色体 VII-L 的端粒附近)实现同源重组,进而由 polyC_{1~3}A 序列“愈合”(Walmsley et al. 1983;Lustig 1992),这样便产生了新的染色体 VII-L 端粒,其中 *ADH4* 基因座后面是 *URA3* 基因和一段约 400bp 的 polyC_{1~3}A 序列。含有这样的新端粒的单倍体株是具有生命力的,因为没有必需基因位于因同源重组而去除的 *ADH4* 基因的远端。虽然这个新的含遗传标记的染色体 VII-L 端粒可以理解成是人工合成的,因为它缺乏天然对等物上相关的内部重复序列(Zakian 本书;见下文),但是它仍很稳定,并且很明显,可以完成正常端粒的功能。

URA3 基因特别适用于研究 TPE 的性质,因为用简单的平板实验即可检测细胞中该基因活化与否(Boeke et al. 1987)。不表达 *URA3* 基因的细胞可以在含 5-氟乳清酸(5-FOA)的平板上生长,5-FOA 可以杀死表达 *URA3* 的细胞,而要在不含尿嘧啶的平板上生长,则必须表达 *URA3*。因此在正常的染色体基因座(染色体 V, 远离端粒)携带野生型 *URA3* 基因的菌株,在含有 5-FOA 的平板上以非常低的频率(约 10⁻⁷)形成菌落。对于等位基因 *URA3* 缺失的菌株,可以在这样的平板上正常生长。相反,野生型 *URA3* 菌株能在无尿嘧啶的平板上生长,而 *ura3⁻* 则不能。当 *URA3* 位于染色体 VII-L 的端粒时,人们观察到一种新的表型:约 33% 的细胞能在 5-FOA 平板上生长,这表明培养基的部分细胞中该基因受到阻抑,另一部分细胞中该基因则不受阻抑(见图 6-2B)。因为 5-FOA 抗性的菌落中含有能在无尿嘧啶培养基中生长的细胞,故端粒对 *URA3* 的阻抑是可逆的(很明显不是由于突变的原因)。要使 *URA3* 受到阻抑,则它必须位于端粒附近,因为当该基因单纯地插入到 *ADH4* 基因座,或者其两侧有短的 polyC_{1~3}A 重复序列时,该基因不受阻抑(图 6-2B)。

TPE 的可逆性可以利用 *ADE2* 作为报道基因清楚地观察到(见图 6-3),野生型(*ADE2*)形成白色菌落,而 *Ade2⁻* 细胞(由于 *ade2* 基因突变或是 *ADE2* 基因受到阻抑)形

A 通过同源重组，在染色体VII-L端粒置入 $URA3$



B $URA3$ 的染色体定位

FOA抗性克隆比例

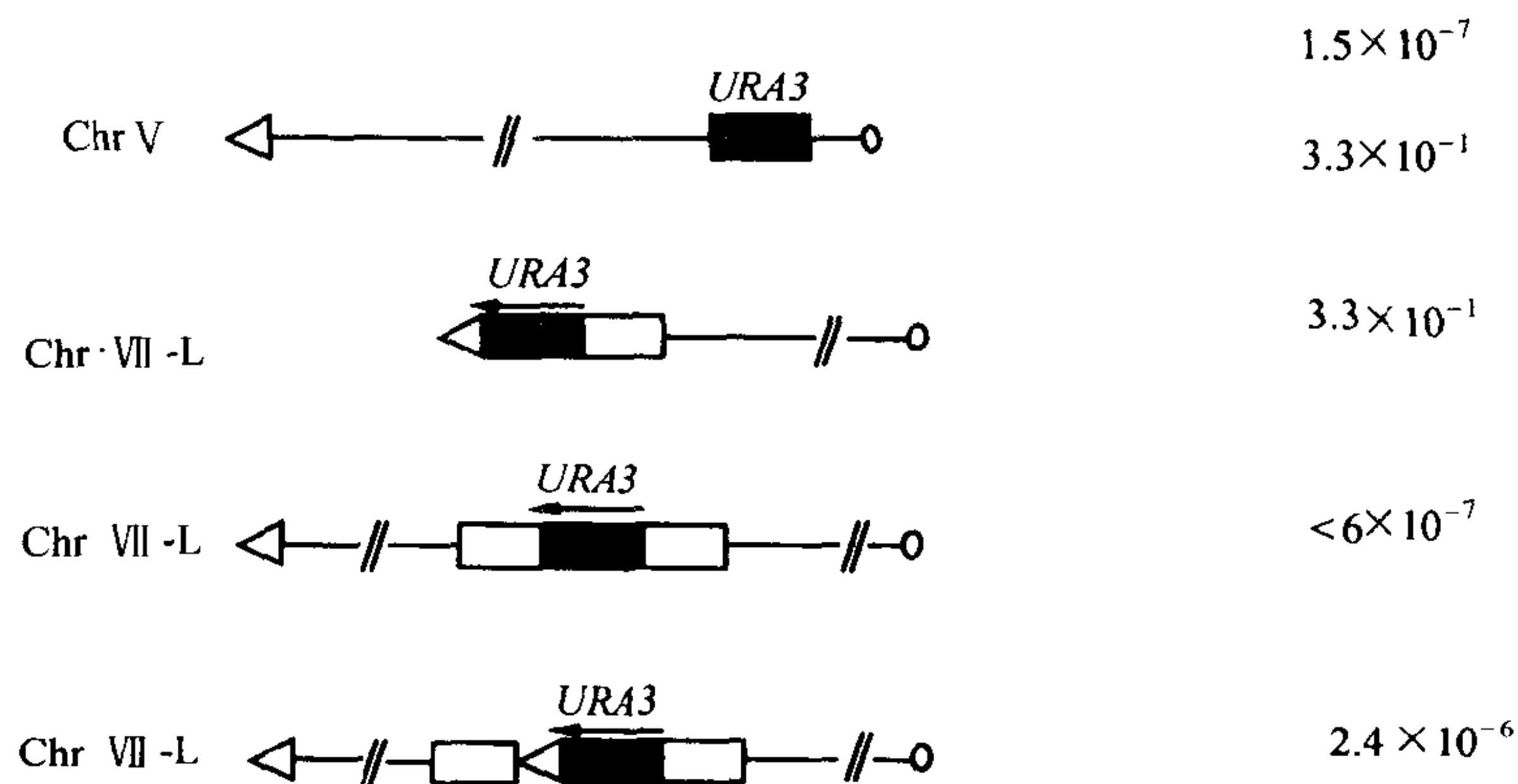


图 6-2

A. 通过同源重组产生遗传标记的酵母端粒。ADH4 基因距染色体 VII-L 端粒约 20kb (空心三角形所示)，与线性 DNA 片段 (含有与 $URA3$ 基因以及 83bp 的 polyC₁₋₃A 短序列相连的部分 ADH4 基因) 进行同源重组，从而产生 $URA3$ 标记的染色体 VII-L 端粒。在此过程中，polyC₁₋₃A 短序列被延长，达到天然端粒特有的长度 (引自 Gottschling et al. 1990)。B. $URA3$ 如果位于端粒附近，它将被阻抑。如果在染色体 V 着丝粒附近的正常位置， $URA3$ 则被表达。在药物 5-FOA 的存在下细胞是不能生长的。当 $URA3$ 位于染色体 VII-L 的人工端粒附近时 (如 A 所示)，通过 FOA 抗性克隆的菌落显示，该基因在近 1/3 的培养细胞中受到阻抑。当 $URA3$ 基因插入到 ADH4，即使其两侧均有 polyC₁₋₃A 序列，也观察不到阻抑现象。在含端粒重复序列的构建体中，FOA 抗性的菌落略有增加，这是由于在此位点自主产生了端粒。图中所示的数据为平均值，引自

Gottschling et al. (1990)。

成有红色色素的菌落。在内源性 ADE2 基因突变的菌株中，当 ADE2 基因位于染色体 VII-L 的端粒附近时，细胞会产生红白分区的菌落，再次表明该基因的花斑阻抑。重要的是，在单个克隆的细胞中有较大的红白斑点表明，无论是阻抑还是去阻抑状态都是以半稳定的形式遗传的。这和因果蝇白眼基因向异染色质区域易位导致的复眼花斑在视觉上极为相似，因此推断酵母的 TPE 和果蝇的 PEV 可能有着共同的分子机制 (Gottschling et al. 1990)。

TPE 另外两个重要的共性是后来发现的 (Renauld et al. 1993)。第一，阻抑似乎是从染色体末端持续扩展。这一点可从下面看出：当更接近端粒的基因主动转录时，端粒相连基因的沉默状态便消除 (Renauld et al. 1993)。端粒远端基因的阻抑似乎需要端粒近端基

因的失活(含有 Y' 重复元件的天然端粒,情况有所不同,见下文)。然而,当两个报道基因位于同一个细胞不同的端粒时,各自的转录状态似乎是没有关系的。因此,同一细胞不同端粒的 TPE 看起来是相互独立的。总之,这些初步的研究表明 TPE 是:① 花斑样的,因为特定端粒基因在群体中的单个细胞内存在两种不同的转录状态(“开”或“关”);② 通过多细胞分裂以半稳定的方式遗传;③ 从单个染色体末端持续扩展,每个细胞内端粒之间的方式可能有所不同。

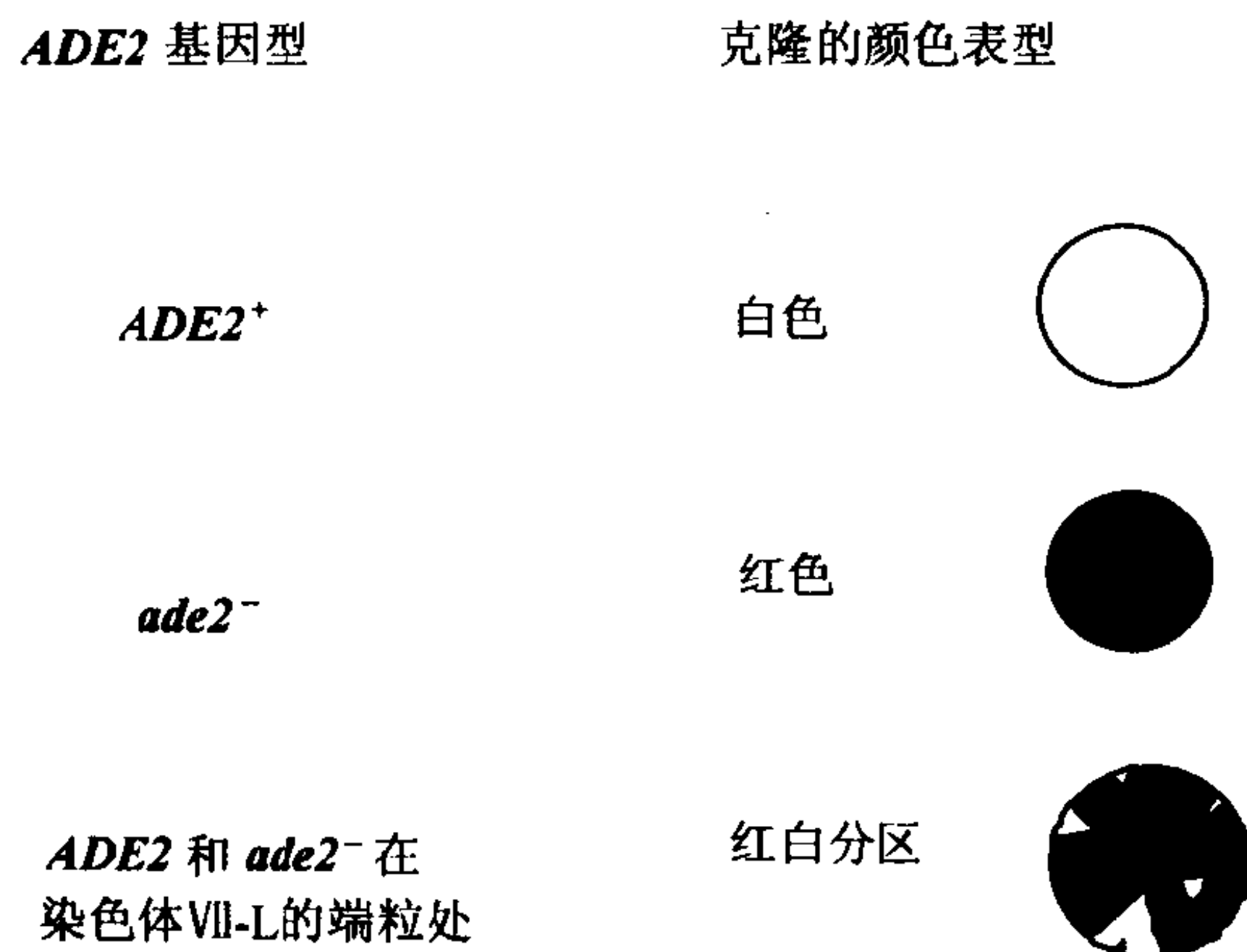


图 6-3 酵母中的 PEV

端粒 *ADE2* 基因的阻抑是不稳定的。*ADE2*⁺ 细胞产生一致的白色菌落,而 *ade2*⁻ 细胞或 *ADE2* 被沉默子稳定阻抑 (Sussel et al. 1993)。由于色素的堆积而产生均匀红色菌落。在天然 *ADE2* 突变的菌株,当 *ADE2* 位于人工染色体 VII-L 的端粒时(如图 6-2A),细胞产生红白分区的菌落,表明了端粒 *ADE2* 基因的花斑阻抑。在图中所描述的例子中,菌落产生于阻抑状态的细胞,因此其中心是红色的。在克隆生长的过程中,如果转向去阻抑状态,则会产生白色区域,在这一区域如果再发生阻抑状态的转向,则会导致在菌落外围形成小的红斑。(引自 Gottschling et al. 1990。)

HM 沉默子和端粒的 DNA 调控元件和结合蛋白

HM 沉默子

HML 和 *HMR* 沉默接合型基因座的两侧均为顺式作用负调控元件,这些元件最初是通过对可自主复制质粒的缺失分析鉴定出来的(见图 6-1)(Abraham et al. 1984; Feldman et al. 1984)。在这两种情况下,左翼元件(essential, E, 意为基本)与右翼元件(important, I, 意为重要)相比,左翼元件对于阻抑更为关键。对 *HMR* 基因座的随后分析表明, E (现称 *HMR-E*) 元件和增强子有相似的特性(方向和距离非依赖性),“沉默子”的名称由此而来 (Brand et al. 1985)。这一工作还表明, *HMR-E* 元件是正常染色体环境下 *HMR* 沉默所必需的,而 *HMR-I* 元件则看起来可有可无。尽管 *HMR-I* 元件的作用尚不明确,但它有助于 *HMR* 的沉默。因为当 *HMR-E* 元件的作用因突变而减弱时,它就成为阻抑的基本条件(见下文; S. Buck & D. Shore 未发表)。人们还对处于正常染色体环境下的 *HML* 沉默子进行了分析,分析的结果却有所不同 (Mahoney & Broach 1989)。在 *HML-E*

和 *HML-I* 沉默子在功能上看起来是同等且丰足的,因为它们两个中的任何一个都可以独立完成 *HML* 的沉默。

人们还对 *HMR-E* 和 *HML-E* 沉默子元件进行了系统的缺失分析(Brand et al. 1987;Kimmerly et al. 1988; Mahoney et al. 1991)。对于 *HMR-E*,通过一组严格的重构实验(McNally & Rine 1991)已经基本上确定出其基本组成成分。*HMR-E* 的三个不同的沉默子调节位点已被精确地确定出来,每一个都是已知蛋白的结合位点(见下文和图 6-4)。*HML-E*、*HML-I* 和 *HMR-I* 元件都含有上述三个位点中的两个,这更增加了沉默子基本成分可被鉴定出的可能性。

沉默子 A 元件是 ARS 的共有序列

所有 4 个沉默子都含有一个叫 A 的位点,该位点和所有已知 ARS 的 11bp 共有序列一致(Bread et al. 1982)(见图 6-4)。这种元件叫做 ARS 共有序列(ARS consensus sequence, ACS)或者核心元件,看起来是染色体的原点功能所必需的(Deshpande & Newlon 1992; Newlon & Theis 1993)。ACS 是一种六肽复合体的结合位点,这种复合体叫做原点识别复合体(origin recognition complex, ORC)(Bell & Stillman 1992; Bell et al. 1993)。ORC 基因中的两个沉默缺失等位基因的鉴定,充分证明了这种复合体参与了转录沉默(至少在 *HMR* 基因座)(Foss et al. 1993; Micklem et al. 1993; J. Rine 个人通讯)。

A 元件在沉默中发挥何种特殊作用? 一种观点来自 Miller 和 Nasmyth 的研究(1984),他们发现在 *SIR3* 突变株中 *HMR* 位点的沉默重建必须经过 S 期,因而推断从 *HMR-E* 沉默子起始的 DNA 复制为重建阻抑所必需。和这一推断相一致,近期的实验结果证实 *HMR-E* 沉默子的功能实际上是作为染色体的复制起始点,而且这种特性与其作为沉默子的能力有关(Rivier & Rine 1992a, 1992b)。然而这种模式还有很大的争议,因为 *HML* 沉默子在染色体中似乎不能作为染色体的复制起始点(Dubey et al. 1991),那么很可能沉默和 ACS 的起始点功能以及结合 ORC 是不相关的,但目前已有的突变尚不能将这两种特性简单地分开。另一种可能是沉默子起始点激发为建立沉默所必需,在 *HML* 仅在阻抑丧失且需要重建阻抑这样极为罕见的情况下才需要(Laurenson & Rine 1992)。总之该模型需要实验直接证实。

沉默子元件 E 和 B 是多功能调控蛋白 RAP1 和 ABF1 的结合位点

在四个沉默子中的每个位点,均发现 ACS 要么分别和 E 或 B 位点结合,要么同时和 E、B 结合。E、B 分别是调控蛋白阻抑子/活化因子蛋白 1(RAP1)和 ARS 结合因子 1(ARS binding factor, ABF1)的结合位点(见图 6-4)。*HML-E* 和 *HMR-E* 沉默子中也有 RAP1(也称为 TBF、TUF、SBF-E 和 GRF1)结合位点。有趣的是, RAP1 结合位点也在多种酵母基因的启动子中存在,包括许多大量转录的基因及必需基因,如编码核糖体蛋白和糖酵解基因(Shore 1994)。在这样的情况下, RAP1 似乎起着转录活化因子的作用。RAP1 基因对细胞的生存是必需的,它编码一个由 827 个氨基酸残基组成的蛋白质(Shore & Nasmyth 1987),和其他已知的蛋白质无明显相似性,但可能与 ABF1 有相似性(Diffley & Stillman 1989a)。不仅在 *HM* 基因座,而且在端粒, RAP1 在转录沉默中均发挥重要作用(Kutz & Shore 1991; Sussel & Shore 1991; Kyrion et al. 1993; Moretti et al. 1994)。

RAP1 的调节功能似乎是依赖于邻近序列 (Shore & Naomlyth 1987; Buchman et al. 1988b)。对这一蛋白的研究中主要问题是阐明它如何在染色体的不同位置表现出相反的效应 (Shore 1994)。

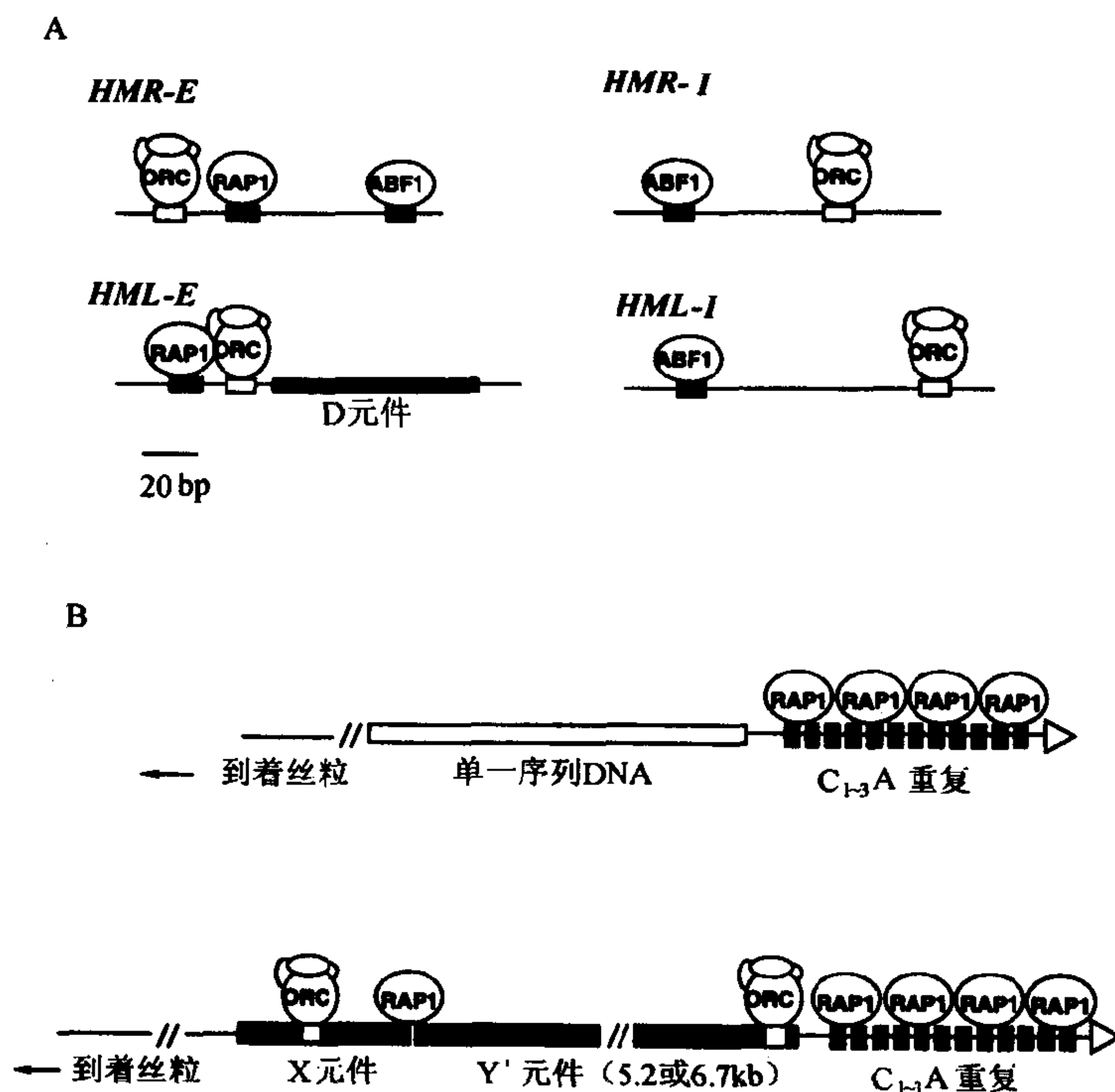


图 6-4

A. *HM* 基因座沉默子元件和结合蛋白。该图(按比例)示意出四种 *HM* 沉默子内已知蛋白结合位点的排列。现已通过实验揭示出在 *HMR-E* 和 *HML-E* 处蛋白结合位点在沉默中的作用。目前尚不清楚 *HML-E* 中 D 元件是否是一个蛋白结合位点, 详见下文。B. “人工”(上)和“天然”(下)端粒的示意图指出了已知或可能参与 TPE 的蛋白结合位点(非比例)。注意, C_1-3A 重复序列可能含有 20 个或更多的高亲和性 RAP1-结合位点。三角形代表实际的染色体末端, 该末端可能在 TPE 中发挥作用, 尽管酿酒酵母末端结合蛋白还未确定 (Zakian 本书)。

4 个 *HM* 沉默子中有三个含有 ABF1 蛋白(也称为 SBF-B、PBF1、GF1 及 BAF1)的结合位点, 只有 *HML-E* 元件缺乏确定的位点(见图 6-4A) (Shore et al. 1987; Buchman et al. 1988a, 1988b)。ABF1(即 ARS 结合因子 1), 顾名思义, 最初被认为是 ARS 结合蛋白, 它可以结合在 ACS 的附近 (Diffley & Stillman 1988; Francesconi & Eisenberg 1989)。ABF1 和 RAP1 有几个共性: 数量相对很多; 为基本的序列特异性 DNA 结合蛋白 (Diffley & Stillman 1989a; Halfter et al. 1989; Rhode et al. 1989; Francesconi & Eisenberg 1991); 除了结合于沉默子外, 还与很多启动子元件结合 (Diffley & Stillman 1989a; Halfter et al. 1989; Rhode et al. 1989; Francesconi & Eisenberg 1991)。在人工构建的启动子中, ABF1 似乎是作为较弱的转录活化因子而单独起作用。然而当和其他因子共同作用时, 则表现出协同作用, 引起强烈的转录活化 (Buchman & Kornberg 1990)。如上所述, ABF1 和 RAP1 之间有较低程度的序列相似性 (Diffley & Stillman 1989a), 其意义有

待于进一步探索。ABF1 参与 *HM* 基因座沉默的观点已通过验证基因突变的方法得到了证实,该基因突变后可导致 *HMR* 的沉默缺失(J. Rine 个人通讯)。ABF1 似乎通过它的转录激活功能刺激 *ARS1* 复制起始点的发放,因为它可以被 *RAP1* 或 *GAL4* 转录活化因子取代(Marahrens & Stillman 1992)。

沉默子由什么构成?

尽管我们对几个沉默子元件已有了较深入的了解,但对它足以发挥沉默功能所必需的最小成分还不甚了解。*HMR-E* 沉默子在功能上是冗余的(redundant),其独特性在于包含所有三个沉默子调控位点。尽管 E 位点的缺失(被 *RAP1* 结合)的确可导致沉默作用的部分丧失,但 A、E、B 三个位点的任何两个组合就足以发挥阻抑作用(Brand et al. 1987; Kimmerly et al. 1988)。然而,*ARS1* 复制起始点也包含 A 和 B 位点,尚未证实它自己就可以发挥沉默功能,但在提供一个 E 位点后,仅在 *HMR* 处作为较弱的沉默子发挥作用(Kimmerly et al. 1988)。*HML-E* 沉默子虽然只含有和 *HMR-E* 共同的 A 和 E 位点,但却比最初想像的要复杂的多,因为在该基因座要发挥稳定的阻抑功能,还需要叫做 D 的第三个位点,D 位点的功能尚未确定(见图 6-4A)(Mahoney et al. 1991)。

三个沉默子调节位点 A、E、B 共同作用就足以实现阻抑,这方面最有力的证据来自上面提到的重建实验。一个包含这三个位点(由随机序列分开)的“合成沉默子”就足以在 *HMR* 位点实现阻抑(McNally & Rine 1991)。和天然 *HMR-E* 沉默子不同的是,合成的沉默子绝对需要 A 位点才能达到阻抑。虽然引起这种差异的原因还不清楚,但一种可能是天然 *HMR-E* 沉默子上的多个与 ACS 相近的序列可以替代 A 元件(Brand et al. 1987)。最后,尽管对沉默子的异位活性还没有被系统地研究,但现在已经知道 *HMR-E* 可以阻抑正常染色体基因座 *HSP82* 基因的基础转录(Lee & Gross 1993)。

端粒

$C_{1-3}A$ 重复序列

酿酒酵母的端粒由可变长度的 $C_{1-3}A$ 重复序列组成。 $C_{1-3}A$ 的典型长度为 150~450bp,它与更长、更复杂的两种不同类型的内部重复序列相连(见图 6-4B)(Zakian 本书)。许多证据表明在端粒沉默中末端 poly($C_{1-3}A$)序列具有重要作用。首先,TPE 最初是用缺乏普通亚端粒 X 和 Y'序列的人工端粒证明的(见图 6-2A),这样的话,这些端粒可能只是由直接连接在独特序列的 DNA 的 poly($C_{1-3}A$)片段组成。其次,在其他野生型细胞中产生延长的 $C_{1-3}A$ 片段的实验显示,片段长度增加与受阻抑细胞的数量增加有关(Kyrion et al 1993)。这一结果有力地表明重复片段本身处于阻抑状态。最后,现已证明较长的内部(非端粒)poly($C_{1-3}A$)片段能够起到沉默子的作用(Stavenhagen & Zakian 1994)。这一事实表明,poly($C_{1-3}A$)片段本身足以在不同的染色体部位发挥沉默子元件的作用;同时某些尚未确定的染色体末端的特性不是沉默所必需的。然而染色体末端在 TPE 中可能具有特定作用(见下文)。

对于 TPE, poly($C_{1-3}A$)片段的重要特征几乎无疑地体现在多个 *RAP1* 结合位点有规律地出现(Berman et al. 1986; Longtine et al. 1989; Gilso et al. 1993b; Zakian 本

书)。尽管在不同的端粒中, RAP1 结合位点在序列和位置的精确性上有所差异, 但许多这样的位点(特别是 CACCCACACA 这样形式的位点)在体外是高亲和性位点。再者, 在克隆的 $C_1\sim_3A$ 重复序列中, RAP1 结合位点以极高的频率出现(可高达每 18bp 出现一次), 因此有理由相信, 在体内, 这些位点的很大部分已被占据, 当然这个问题尚未被直接阐明(Gilson et al. 1993b)。由于在发现 TPE 之前就已确定 RAP1 是端粒结合蛋白, 因此它在端粒处的功能起初令人不解。现在发现 RAP1 和端粒染色质结合(Weight et al. 1992)时采取一种称为“端体”的非核小体结构, 这就更能说明蛋白质实际上是在端粒处发挥某种作用, 这已被几个不同的遗传实验所证实。当突变细胞在半允许温度下长时间生长时, RAP1 的温度敏感致死性突变可导致端粒缩短(Conrad et al. 1990; Lustig et al. 1990), 其原因可能是丢失了 $C_1\sim_3A$ 序列。相反, *rap1'*(沉默缺陷)型突变(可引起 HMR 处的去阻抑)可导致端粒延长(Sussel & Shore 1991)和 TPE 的增强(Buck & Shore 1995)。RAP1 羧基末端结构域的过度表达也会导致端粒的延长(Conrad et al. 1990; Hardy 1991), 这种情况与 TPE 的显著减弱有关(Wiley & Zakian 1995)。最后, 在酵母转化过程中端粒的重新生成受含有 RAP1 结合位点的 $C_1\sim_3A$ 序列的刺激(Lustig et al. 1990; Lustig 1992; 关于端粒长度的调控和重新生成, 详见 Zakian 本书)。RAP1 参与 TPE 的问题将在随后详细讨论(见端粒沉默的建立)。

端粒末端

尽管 poly($C_1\sim_3A$)片段和 RAP1 蛋白在 TPE 中具有明显的重要性, 但有迹象表明染色体末端另一些特性在阻抑中起重要作用。具有讽刺意义的是, 在证明端粒本身在 poly($C_1\sim_3A$)介导的沉默中是非必需的实验中却找到了该结论最有力的证据(Stavenhagen & Zakian 1994)。尽管当短的 poly($C_1\sim_3A$)片段(81bp)位于内部染色体上时, 不足以引起阻抑(见图 6-2B)(Gottschling et al. 1990), 但长一些的片段在非端粒位点确实具有沉默元件的功能(Stavenhagen & Zakian 1994)。这种形式的沉默(基于 $C_1\sim_3A$ 的沉默)和 TPE 的相似之处在于, 它需要 SIR2、SIR3 和 SIR4 功能(不需要 SIR1, 见下文), 如果 RAP1 的羧基端或 DNA 结合结构域过度表达, 这种沉默便会消失。然而有迹象表明, TPE 至少包含一个在基于 $C_1\sim_3A$ 的沉默中不发挥作用的成分。首先, 基于 $C_1\sim_3A$ 的沉默在含有 $C_1\sim_3A$ 重复序列的高拷贝数的环状质粒存在时被解除, 而这样的质粒对 TPE 只有轻度的影响(Stavenhagen & Zakian 1994)。相反, 存在于染色体外的质粒上的端粒 $C_1\sim_3A$ 重复序列能够抵消基于 $C_1\sim_3A$ 的沉默和 TPE(Wiley & Zakian 1995)。第二, 基于 $C_1\sim_3A$ 的沉默, 在靠近端粒时会得到加强, 其加强程度可能比附加额外大量的 $C_1\sim_3A$ 重复序列时大得多。所有这些结果说明, 末端特异性结合因子在 TPE 中发挥重要作用(Wiley & Zakian 1995)。因为酿酒酵母端粒酶的 RNA 片段如果过度表达, 则会引起 TPE 的严重下降(Singer & Gottschling 1994), 所以端粒酶本身在 TPE 中可能发挥直接作用, 或者与对阻抑起重要作用的末端结合因子相互作用。

端粒相关重复序列

如 Zakian(本书)在上面提到并详细讨论的那样, 酵母天然端粒与两种类型的重复元件有关, 这两种重复元件与 poly($C_1\sim_3A$)末端重复序列直接相连。许多端粒含有叫作 Y' 的

高度保守元件的 1~4 个拷贝,该元件直接靠近端粒末端 (Louis & Haber 1992; Louis et al. 1994)。已发现两种大小不同的 Y' 元件(5.2kb 和 6.7kb),两者均含有一个保守的可读框(可能编码 RNA 解旋酶)和一个 ARS 共有元件。在相对 Y' 元件的端粒远端或者缺少 Y' 元件染色体末端的附近发现一种叫做 X 的元件。X 元件的结构比 Y' 变化大,而且更复杂。所有已测序的 X 元件都含有中度保守的长度约为 560bp 的“核心序列”,该核心序列包含 ARS 共有序列(Chan & Tye 1983a,1983b),与一个更短、更保守的重复序列可变嵌和体相连(Louis et al. 1994)。

初步研究表明天然端粒末端的 Y' 元件在 TPE 中起着重要作用(Renauld et al. 1993);*URA3* 报道基因的阻抑可以从天然染色体 V-R 端粒扩展,比从缺乏这种重复序列的人工衍生物上扩展得更远(下文将详细讨论),造成这种效应的 Y' 元件的具体特征尚未确定,X 重复序列元件(很明显,不存在于染色体 V-R 上)在 TPE 中的可能功能也未确定。也许有些令人惊讶,在 Y' 元件中插入 *URA3* 基因,对它的表达并无明显影响(Louis & Haber 1990),而 Y' 元件本身似乎被转录了,尽管这种作用很弱 (Louis et al. 1994)。一种可能是,Y' 元件逃避了 TPE,但却允许它在附近的端粒远位点上重新启动。在这方面我们还应注意到:X 和 Y' 元件都含有 ACS(ORC 结合位点),它们在 *HM* 沉默子中是重要的调控元件。进一步讲,这些元件间的连接处含有以 $C_1\sim_3A$ 重复序列形式存在的多个 RAP1 结合位点。

反式作用沉默因子

SIR 蛋白

SIR 基因首先是在突变基因筛选中发现的,该突变使任意一个或两个沉默的 *HM* 接合型基因座解除阻抑(Haber & George 1979; Klar et al. 1979; Rine et al. 1979)。经系统分析,确定出 4 种不同的互补群 *SIR1*、*SIR2*(*MAR1*)、*SIR3*(*MAR2*、*CMT*)和 *SIR4* (Rine & Herskowitz 1987)。*SIR2*、*SIR3* 和 *SIR4* 的无效突变会导致 *HMR* 和 *HML* 位点的完全去阻抑,可以通过对稳态 mRNA 水平(这和从 *MAT* 基因座所得的相等)的直接分析和接合效率的大幅下降加以判断(α 和 α 信息的同时表达导致无接合型表型)。*SIR1* 的突变,甚至无效突变也只会引起 *HML* 和 *HMR* 的部分去阻抑(Ivy et al. 1986; Pillus & Rine 1989; Stone et al. 1991)。

依照 Pillus 和 Rine(1989)得出的证据,“渗漏(leaky)”表型不是由于 *HM* 基因座均匀的部分阻抑,而是由于培养基中部分细胞产生了全阻抑。(这种异常现象和 *SIR1* 在沉默中的特殊作用将在下文详细讨论。)

所有 4 种 *SIR* 基因已经被克隆,它们的 DNA 序列和推测的蛋白质序列已被确定(Shore et al. 1984; Marshall et al. 1987; Stone et al. 1991)。似乎没有一种 *SIR* 蛋白质含有 DNA 结合基序,这些基因的突变也不影响其他蛋白和沉默子 DNA 的结合(Shore et al. 1987; Buchman et al. 1988a)。这些结果尽管是负面的,但表明了 *SIR* 蛋白并不和 DNA 直接作用,而是和已知的沉默子结合蛋白间接作用后发挥作用。如下文所讨论的那样,*SIR3* 和 *SIR4* 蛋白通过与 DNA 结合蛋白 RAP1 的相互作用来控制 *HM* 沉默子和端

粒的作用(至少部分如此)(Moretti et al. 1994)。

对于这些蛋白质的可能具有的生化功能,目前所推测出来的 SIR 蛋白质序列并没有提供有关线索,但 SIR4 例外,它的羧基末端与核纤层蛋白有较弱的同源性(Diggley & Stillman 1989b)。这种推断的 SIR4 螺旋-螺旋区域可能参与介导自我连接(self-association)(Chien et al. 1991)。此外,人们推测这个区域允许 SIR4 与假定的核纤层蛋白同源物相互作用,从而与核膜结合,以便将端粒和 *HM* 基因座附着在核膜上(Diggley & Stillman 1989b; 见下文)。SIR4 羧基端还有一些特别的遗传特性。这一区域的表达能够反式互补只表达该蛋白氨基端的 *SIR4* 突变体(Marshall et al. 1987)。然而 SIR4 羧基端或整个蛋白质的过度表达会引起沉默 *HM* 基因座和端粒上的显性失活(dominant-negative)去阻抑(Ivy et al. 1986; Marshall et al. 1987; Aparicio et al. 1991)。

尽管两个 *HM* 基因座的完全阻抑需要 4 种 SIR 基因,但只需三种 SIR(*SIR2*、*SIR3* 和 *SIR4*)就可以实现端粒沉默(Aparicio et al. 1991)。*SIR1* 的突变在人工端粒上(含有一个相邻的 *URA3* 报道基因)没有可检测的阻抑作用。与此相反,*SIR2*、*SIR3* 和 *SIR4* 中的任一突变都会引起同一端粒 *URA3* 报道基因的完全去阻抑。综合这个结果以及 RAP1 和组蛋白氨基端的共同作用(见下文),可以推断 *HM* 和端粒沉默一定有相似的机制。端粒沉默不需要 *SIR1*,这提示 *SIR1* 在 *HM* 基因座有特殊的作用。如下所述,*SIR1* 的作用可以部分解释 *HM* 阻抑的稳定性(和端粒上的花斑位置效应相比)。

值得注意的是,在这些基因中没有一个 SIR 基因是细胞存活所必需的,这些基因的突变,无论是单个、两个或三个联合突变对细胞的生长均无明显的影响(Shore et al. 1984; Ivy et al. 1986; Marshall et al. 1987; Laurenson & Rine 1991; Stone et al. 1991)。这很可能说明 SIR 基因的功能仅限于阻抑接合型基因和那些至今未鉴定的与端粒直接相连的基因。但也有证据显示这些蛋白在细胞中有别的功能。例如,*SIR2*(而不是别的 SIR 基因)以某种方式参与阻抑重复的核糖体 RNA 基因座处有丝分裂的重组(Gottlieb & Esposito 1989)。此外,*SIR3* 和 *SIR4* 似乎为端粒的聚集和细胞核周围的定位所必需,也确保维持染色体稳定在正常水平(Palladino et al. 1993; 见下文)。最后,*SIR4* 中还发现有“功能获得性”突变,可以导致细胞寿命延长 30%(Kennedy et al. 1995)。这种异常表型需要有 *SIR2*、*SIR3* 野生型的拷贝(而不是 *SIR1* 拷贝),这可能反映出参与细胞老化的未确定基因沉默作用的增强。有意思的是 *Sir4-42* 突变还可以增加抗应激性,这是一种酵母与其他生物长寿有关的表型。然而,与细胞寿命的增加不同,应激抗性和 *Sir4* 的无效突变有关,最大可能是由于不同基因座沉默的丧失。这些例子表明,随着对酵母生物学其他方面的遗传分析,可能揭示 SIR 介导的阻抑的更多功能。

RIF1

RIF1(RAP1 相互作用因子 1)基因是在对能与 RAP1 的羧基端片段(第 653~827 个氨基酸)相互作用的蛋白质进行双杂交筛选中时鉴定出来的(Hardy et al. 1992b)。虽然至少在双杂交反应中仅需一个较短的羧基末端区域来和 RAP1 的羧基端相互作用,但据推测 *RIF1* 基因的蛋白产物长度接近 2000 个氨基酸残基。*RIF1* 基因对于生存不是必需的,该基因的突变(包括大的缺失)对细胞的生长也没有明显的影响。在 *HMR* 基因座首次发现 *RIF1* 在沉默中的作用,在 *HMR-E* 沉默子的 A 元件(ACS)缺失时该基因对于

HMR 基因座的沉默是必需的(Hardy et al. 1992b)。当 *HMR-E* 沉默子是完整的或缺乏 B 元件(ABF1 结合位点)时,*RIF1* 突变没有影响。该表型和 *rap1⁻* 突变(在 RAP1 羧基端的点突变)的表型非常相似(Sussel & Shore 1991)。事实上,在双杂交系统中,*rap1⁻* 杂交蛋白质在和 RIF1 杂交蛋白质相互作用是有缺陷的(Hardy et al. 1992b)。令人惊讶的是,*RIF1* 的突变对端粒的沉默具有相反的效应(Kyrion et al. 1993),导致端粒的阻抑加强。综合这一结果和对 *rap1⁻* 突变体以及端粒长度对 *HM* 沉默的影响的深入研究,发现在调节 *HM* 基因座和端粒沉默的平衡调节中,*RIF1* 起着至关重要的作用(Buck & Shore 1995)。下面将对此进行详细讨论。

SUM1

已经发现有很多其他基因在沉默中发挥作用。也许最吸引人的是 *SUM1*(*MAR1* 的阻抑子)基因(Klar et al. 1985)。这个基因(*SUM1-1*)的单一等位基因被确定为 *MAR1* (*SIR2*)突变的阻抑子,后来又证明它可以阻抑所有的 4 种 *SIR* 基因突变(Livi et al. 1990; Laurenson & Rine 1991)。*SUM1-1* 突变强烈阻抑 *SIR* 突变体的 *HMR* 沉默缺陷,但是对 *HML* 只有很弱的影响。*SUM1* 对端粒沉默的影响尚未见报道。*SUM1* 对于 *sir* 突变的阻抑是上位的,这提示它在 *SIR* 基因的下游发挥作用。然而,由于有关 *SUM1-1* 突变性质的相互矛盾的报道导致了对野生型基因功能产生两种不同的观点。对 *SUM1-1* 的最初分析表明,该突变对于野生型是隐性的。于是人们提出了一种模型:*SUM1-1* 编码一种激活物,它对于 *HM* 基因座而不是 *MAT* 基因座的转录是必要的。在该模型中,人们提出 *SIR* 基因编码 *SUM-1* 负性调节物。后来的研究表明,*SUM1-1* 至少在一定的遗传背景下,对野生型是显性的(Laurenson & Rine 1991),这与认为该等位基因是“功能获得性”或“功能改变性”突变的观点相一致。这种有关 *SUM1-1* 突变的相反的观点使人们进一步推测,*SUM1* 蛋白本身就是受阻抑染色质的一个组分。*SUM1* 基因已经被克隆出来(M.-H. Chi & D. Shore 未发表),已经构建了 *sum1* 无效突变,这种突变不阻抑 *sir* 突变引起的沉默缺陷,从而有力地支持了 *SUM1-1* 是异常功能改变性突变的模型。尽管 *SUM1* 在沉默中精确的分子作用还有待于进一步明确,但是已克隆的 *SUM1* 基因为我们达到这一目的提供了新的途径。

NAT1/ARD1 氨基端转乙酰酶

ARD1 和 *NAT1* 基因的蛋白质产物所形成的异源二聚体氨基-末端转乙酰酶参与了转录的沉默(Whiteway et al. 1987; Mullen et al. 1989; Park & Szostak 1992)。这两个基因中的任何一个发生突变都会导致显著的端粒阻抑丧失以及 *HML* 的沉默的丧失。对 *HMR* 处的效用只能在 *HMR-E* 沉默子的个体元件缺失后才可以观察到。参与沉默的 NAT1/ARD1 底物现在还不清楚。

端粒沉默的建立

端粒和 *HM* 基因座的沉默是远距离作用的一种方式:在端粒末端或沉默子检测不到沉默,而在与这些调控元件邻近的基因中则可检测到沉默。从这一点推断,端粒和沉默子

一定能够产生一种信号,然后该信号沿着染色体扩展,引起附近基因的阻抑。对这种启动过程的分子本质(在此我称之为“沉默的建立”)现在已经有所了解。在端粒和 *HM* 基因座起关键作用的是 *RAP1* 蛋白,它似乎通过将 *SIR* 蛋白复合体吸引到 DNA 上,从而在这些位点发挥作用。对 *Rap1*、*SIR1* 和 *HM* 沉默子元件的遗传研究表明,这种吸引功能的效率在决定 *HM* 基因座和端粒受阻抑状态的稳定性上起着重要的作用。

端粒沉默所必需的 *RAP1* 羧基端结构域

RAP1 在端粒沉默中的作用是在对 *RAP1(rap1-5)* 中温度敏感性(temperature-sensitive, ts)突变基因的内部阻抑子的研究中发现的(Kurtz & Shore 1991)。现已确定出三个不同的等位基因(*rap1-16*、*rap1-17* 和 *rap1-18*,统称为 *rap1'* 突变体),它们都产生截短的蛋白质,即除去该蛋白羧基端 144~165 位氨基酸,包括 *rap-1* 错义突变的位点(见图 6-5, *RAP1* 突变位点的定位和推断的功能区域)(Kyrion et al. 1992)。*Rap1'* 突变对于端粒长度的调控有很大的影响,导致端粒 $C_1\sim_3A$ 片段比野生型或 *rap1-5* 细胞的 $C_1\sim_3A$ 片段长出 4kb(Kyrion et al. 1992; Zakian 本书)。此外,*rap1'* 的突变导致 TPE 丧失(这是 *HMR* 处沉默非常明显的减弱)和生长性缺陷。这些突变对野生型 *HMR* 基因座很少或根本没有作用,尽管在体外构建的截短性突变导致 *hmrΔA* 沉默子阻抑的严重丧失及 *hmrΔB* 沉默子中等程度的阻抑下降(Morette et al. 1994)。近期的诱变研究证明羧基端的 28 个氨基酸残基在 TPE、端粒长度调控和 *HML* 沉默中有重要作用。

因为 *rap1'* 突变导致端粒结构的巨大变化($C_1\sim_3A$ 片段长度延长约 10 倍),所以有理由认为,该突变体的效应引起了端粒沉默的可见丧失。例如,TPE 的强度可能与基因启动子到染色体最末端的距离成反比。然而,通过一系列巧妙的实验,Lustig 和他的同事排除了这种可能,且证明在其他野生型细胞中,端粒的延长实际上是提高了 TPE(Kyrion et al. 1993)。通过与含有标记端粒的 *rap1'* 细胞进行遗传杂交,作者获得了 *RAP1* 野生型孢子,该孢子已经通过遗传从 *rap1'* 亲代细胞中获得了延长的端粒。在所检查的每个标本中,含有延长端粒的孢子克隆中的受阻抑细胞都多于等位基因克隆(通过遗传获得了正常长度的端粒)。这一结果表明 *rap1'* 细胞不能引起端粒阻抑的原因不是端粒长度的增加,而是与建立阻抑直接相关的功能丧失。

利用由异质源 DNA 结合结构域与 *RAP1* 部分融合组成的杂合蛋白所进行的实验,使我们能够深入了解转录调控中该蛋白的双重作用。早期的研究利用 *GAL4* DNA 结合结构域(G_{BD})-*RAP1* 杂合体确定出在该蛋白羧基端(第 630~692 个氨基酸残基,见图 6-5)附近的区域,当定向到含有上游 *GAL4* DNA 结合位点(UAS_G)的启动子时便可以激活转录(Hardy et al. 1992a)。 G_{BD} -*RAP1* 杂合体(含有该蛋白羧基端的 1/3)的过度表达对 *HMR* 处的沉默产生显性失活效应,甚至在沉默子中不含 *GAL4* 结合位点时也是如此。这些杂合体也缺少 *RAP1* DNA 结构域(Henry et al. 1990; D. Balderes & D. Shore 未发表)。然而,当从 *RAP1* 启动子表达时,再定向到含有 UAS_G 位点的突变 *HMR-E* 时,这些相同的 G_{BD} -*RAP1* 杂合体可以在 *HMR* 中产生沉默(Buck & Shore 1995)。这种“定向”的沉默系统在 *RAP1* 上确定出一个短的羧基端区域(第 667~827 个氨基酸残基),至少在 *HMR* 的环境下,足以建立阻抑。我们还要注意 *RAP1* 的环境依赖活性在 G_{BD} -*RAP1* 杂合体中仍然保存,而多数情况是根据它们结合的环境可以活化或阻抑转录。

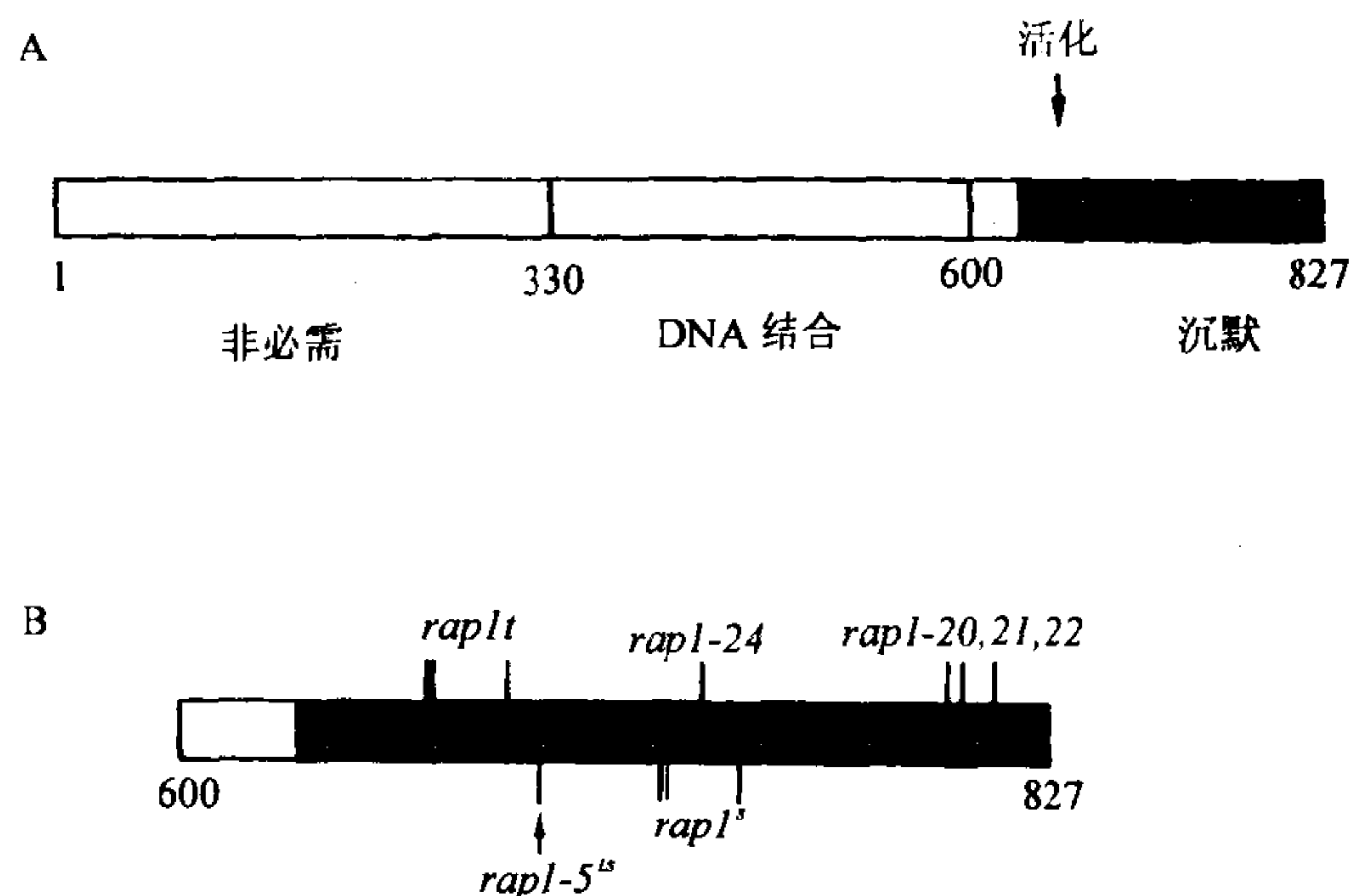


图 6-5

A. 遗传学和生物化学研究所鉴定的 RAP1 功能结构域图谱。RAP1 蛋白的长度为 827 个氨基酸残基, 含有位于中心的 DNA 结合结构域(330~600 个氨基酸残基)。该结构域和其他结构域没有明显的相似性(Henry et al. 1990)。该蛋白氨基端 1/3 对于细胞的生存是非必需的, 其功能不详(L. Sussel & D. Shore 未发表)。通过研究 GAL4 DNA 结合结构域(G_{BD})和 RAP1 的杂交蛋白, 发现了一个转录激活域(630~695 个氨基酸)(Hardy et al. 1992a)。这一区域在天然 RAP1 的环境下的功能尚不清楚。许多实验已经确定出 RAP1 的羧基端区域参与了 *HMR* 基因座和端粒的转录沉默。有一个序列, 开始于第 667 个氨基酸残基并扩展到羧基端第 827 个氨基酸残基, 在通过异源 DNA 结合结构域(GAL4)定向到突变的 *HMR-E* 沉默子上后, 足以确立阻抑(Buck & Shore 1995)。B. RAP1 羧基端调控区的详图。图中标出在羧基端影响沉默的不同突变的位置。在细条上面的所有区域均可导致 TPE 的减弱。*rap1^t* 突变体(*rap1-17*, *rap1-18*, *rap1-19*)可分别在编码第 663、684、665 个氨基酸残基处产生终止密码子(Kurta & Shore 1991)。它们都是 *rap1-5'* 突变体(P694L)的阻抑子(Kurtz & Shore 1991)。*rap1^t* 突变体导致端粒延长、*hmrΔA* 沉默的减弱以及端粒沉默的提高(Sussel & Shore 1991; Buck & Shore 1995)。已经确定了四个完全不同的等位基因:*rap1-11*(R747S)、*rap1-12*(G726E、D727N)、*rap1-13*(D727A)和 *rap1-14*(G726E)。在这个区域的一个新的等位基因(*rap1-24*, L736M)可导致端粒的延长, 而 TPE 则略有下降(Liu et al. 1994)。和 *rap1^t* 突变体相似, *rap1-24* 对 *HML* 沉默无明显影响。它对 *HMR* 的影响尚未进行研究。两个截短的等位基因(*rap1-20*, $\Delta 803-827$ 、*rap1-21*, $\Delta 800-827$)和一个错义突变(*rap1-22*, $\Delta H810Y$)导致了 TPE 的全部丧失或严重下降(Liu et al. 1994)。在 RAP1 的羧基最末端区域内, TPE 缺陷的点突变已经被鉴定出来(Liu et al. 1994)。

HMR 处的定向沉默系统的几个特性与端粒沉默有关。 G_{BD} -RAP1 杂交体导致的沉默依赖于 *SIR2*、*SIR3* 和 *SIR4*, 但和 *HMR* 处正常沉默不同的是, 它不依赖于 *SIR1* 的功能。在这方面它类似端粒沉默。此外, G_{BD} -RAP1 杂交可以在 *HMR* 处建立起阻抑, 甚至在 *HMR-E* 沉默子中缺乏所有的三个调控位点时也是如此, 只要有足够多的 UAS_G 位点即

可。在这种情况下,杂合体可能和结合到端粒上的多个 RAP1 分子的排列很相似。最后,定向沉默系统表现出对 *rap1'* 突变的异常反应,这揭示了端粒与 *HM* 基因座间潜在的竞争(见下文)。

RAP1 作用于 *HM* 基因座和端粒以便吸引 SIR 蛋白复合体

因为 RAP1 能够根据其结合位点来激活或阻抑转录,因此这种蛋白一定和其他因子共同作用于启动子和沉默子。有关该蛋白在 *HM* 沉默子和端粒处的作用的模型认为, RAP1 和这些位点处的 SIR 蛋白共同作用,可能是通过蛋白质间的相互作用将 SIR 蛋白吸引到 DNA 上。

支持这个观点的最有力的实验是双杂交系统 (Fields & Song 1989; Fields & Sternglanz 1994)。在该系统中, SIR3 和 SIR4 被确定为和 RAP1 相互作用的蛋白质 (Moretti et al. 1994)。这两个 *SIR* 基因均是利用 RAP1 的羧基末端片段分离出的,该片段含有预先确定的 RAP1 沉默结构域。因为 *SIR3* 和 *SIR4* 是在酵母基因组片段文库筛选中确定出来的,所以有可能双杂交系统检测到的相互作用具有很高的特异性。

RAP1-SIR3 的相互作用可能是直接的,因为在体外没有其他酵母蛋白时也可以发现这种反应。而且任何 *SIR* 基因的突变对于 RAP1-SIR3 双杂交反应都没有或很少有影响。现在还不清楚 RAP1-SIR4 相互作用是否是直接的,因为在体外检测不到这种反应,目前只有和 SIR4 杂合体相互作用的 LexA-RAP1 杂合体可以在 *SIR* 基因突变后自行转变为转录活化因子 (Moretti et al. 1994)。

其他一些双杂交结果还表明, SIR3 和 SIR4 本身可能通过相互作用而形成蛋白质复合体 (Moretti et al. 1994)。利用 GAL4 激活域 (G_{AD})-SIR3 和 G_{AD} -SIR4 杂交体(用 LexA-RAP1 杂交体的文库筛选确定)和体外构建的 LexA-SIR3 杂合体,发现 SIR3 既可以与自身相互作用,也可以和 SIR4 相互作用。这些结果和早期报道的 SIR4 自身相连 (Chien et al. 1991) 的结果共同表明, SIR3 和 SIR4 自己可以形成很大的复合体(至少是四聚体,含有每种蛋白的两个拷贝)。然而,利用双杂交系统在 *sir* 突变株中的研究到目前为止尚未证明 SIR-SIR 相连为 SIR 蛋白与 RAP1 黏合所必需的。例如 RAP1-SIR3 双杂交反应不受任何内源性 *SIR* 基因突变的影响。也许 SIR 之间相互作用的重要性在于形成扩展的结构,此结构参与了从端粒或沉默子元件的起始位点开始的受阻抑的染色质的扩展过程(见下文)。

端粒沉默的不稳定性和 *SIR1* 在 *HM* 基因座沉默建立中的作用

TPE 的一个最令人感兴趣的特点是它的不稳定性,果蝇中有很多这种位置效应现象。与此不同, *HM* 基因座的沉默似乎很稳定。当然,位于 *HML* 和 *HMR* 的内源性接合型基因会受到有效的阻抑。用标准的杂交实验不能检测野生型细胞中这些基因座的转录 (Brand et al. 1985, 1987; Kimmerly et al. 1988), 专门用于检测每个 *HM* 基因座去阻抑的接合实验表明,每 10^5 个野生型细胞中只有不到一个细胞表达了来自天然沉默位点的接合型信息 (Rine & Herskowitz 1987)。而且在 *HM* 基因座利用 *TRP1*、*ADE2* 和 *URA3* 报道基因发现,在培养细胞和单菌落中同样有很大一部分细胞受到阻抑 (Mahoney et al. 1991; Sussel & Shore 1991; Sussel et al. 1993)。端粒和 *HM* 基因座沉默间的真正差异

是阻抑稳定性上的不同,似乎反映出两种位点的,而不是用于测定受阻抑的报道基因的不同,因为端粒上这三个报道基因(*TRP1*、*ADE2*和*URA3*)的阻抑是不完全的,而且至少在后两种情况下有明显的花斑变化(Gottschling et al. 1990)。

尽管在对大量细胞检查时 TPE 似乎是不稳定的,但很明显单个的受阻抑细胞特别易于产生处于受阻抑状态的子代细胞(Gottschling et al. 1990)。这一相反的结论对于端粒报道基因已去阻抑的细胞来讲也成立。因为似乎这两种细胞间在遗传学方面没有明显的差别,因此所观察到的表型的差异一定是外遗传对基因表达影响的结果。这两种状态的相对稳定性在分子水平上了解得很少,但这两种稳定性均可能来自于两种机制,一种机制是阻抑状态可以催化自身的复制,另一种机制是在活化的转录基因座上难以建立阻抑(Pillus & Rine 1989; Lanrenson & Rine 1992)。第一个机制可以解释端粒中沉默状态的稳定性,而后一个机制可以解释端粒上活性(或去阻抑)状态的稳定性。

对 TPE 相对不稳定性的分子水平的初步观察实际上来自于 *sir1* 突变对接合型基因沉默的影响的再次研究,在早期的研究中,Pillus 和 Rine(1989)证明,*MATa* 株 *sir1* 突变中的“渗漏”表型不是培养条件下全部细胞内 *HMLα* 部分去阻抑,而是一部分细胞中这些基因座的全部去阻抑,换句话说,*SIR1* 功能的丢失会引起在 *HML* 发生花斑阻抑。在该处,群体中遗传上相同的细胞可以处于两种截然不同的转录状态:阻抑和去阻抑。端粒中类似的外遗传“开关”现象的发生使得 Gottschling 和他的同事(1990)提出这样的观点:两种类型的阻抑(接合型基因沉默和 TPE)可能彼此相关。后来进行的对 TPE 的 *SIR* 依赖性的研究(Aparicio et al. 1991)确证了这种联系,并提出以一种简单的方式考虑 TPE 的相对不稳定。由于 *HM* 基因座完全沉默需要 *SIR1*,但 *SIR1* 在 TPE 中无任何作用,我们可以想像出一个先提条件:*SIR1* 在 *HM* 基因座中起着特殊的作用,这样便增加了这些位点的阻抑稳定性,使之超出了在端粒中观察到的基础水平(Aparicio et al. 1991)。

Pillus 和 Rine(1989)提出 *SIR1* 功能的分子模型,认为细胞重建阻抑需要 *SIR1* 蛋白质,此种细胞在以前的分裂中未能通过遗传获得沉默状态。他们进一步指出 *SIR1* 与其他三种 *SIR* 蛋白质不同,对于在整个细胞周期中维持阻抑状态不是必需的。对于这种模型的有价值的检测可能需要直接测定在 *SIR1*⁺ 和 *sir1*⁻ 细胞中建立阻抑的频率。如果没有这方面的信息,那将很难排除另一种模型,该模型认为稳定 *HM* 基因座的阻抑需要 *SIR1*,可以防止偶然进入去阻抑状态。沉默子突变或者沉默子结合蛋白质 *RAP1* 的突变均可以导致类似于 *sir1* 突变的表型,这一结果间接表明在阻抑建立过程中,*SIR1* 起着重要作用。特别是,在 *HML-E* 或 *HML-1* 沉默子元件突变时,*HML* 的阻抑是花斑样的(Mahoney et al. 1991),而在 *HMR-E* 沉默子元件的多余部分缺失后(通过位点 A 突变)或在 *RAP1* 基因突变时(*rap1*⁻),*HMR* 处的阻抑失去稳定(Sussel & Shore 1991; Sussel et al. 1993)。

通过采用 *G_{BD}-SIR1* 杂合蛋白质将 *SIR1* 蛋白质定向到 *HM* 基因座和端粒上,对其效果进行了研究,进一步了解了 *SIR1* 在沉默中的作用(Chien et al. 1993)。很明显,将 *G_{BD}-SIR1* 杂合蛋白定向到 *HMR* 上,就会使阻抑不再需要 *HMR-E* 沉默子。在 *HMR* 中由 *G_{BD}-SIR1* 介导的沉默仍然依赖于 *SIR2-4* 和组蛋白 H4。综合起来,这些结果表明:① *SIR1* 的正常作用位点可能就是沉默子元件本身;② *SIR1* 可能自己就能足以把其他 *SIR* 蛋白质吸引到 *HMR* 基因座上,从而在该处建立起受阻抑的染色质结构。*G_{BD}-SIR1* 杂合体还对

TPE 有很大的作用。当将 G_{BD} -SIR1 杂合体定向到含有 GAL4 结合位点(紧邻 $C_{1-3}A$ 重复序列附近)的人工端粒上时, G_{BD} -SIR1 杂合体可以显著增加端粒位点 $URA3$ 阻抑的稳定性(chien et al. 1993), 与基因位于 *HML* 时所达到的水平相近。相反, 当标记的端粒上没有结合位点存在时, G_{BD} -SIR1 杂合体的表达则会引起沉默的下降。这些结果明确地表明 SIR1 在端粒上发挥功能, 还说明天然蛋白质在正常情况下不会这样, 因为它缺乏一种可以使之聚集到端粒上的机制。从这一结果和 *sir1* 突变体的表型可以得出这样的推理: TPE 的不稳定性至少部分是因为端粒不能利用 SIR1。

为什么端粒不能吸引 SIR1 蛋白质以增加端粒沉默的稳定性呢? 很有可能是因为它们缺少存在于 *HM* 沉默子中的顺式调控元件, 这种元件可以吸引 SIR1。ARS 共有序列(A 元件)是这样位点的最佳候选序列, 它存在于所有的 *HM* 沉默子中, 而不存在于人工端粒(已经研究了它的 *SIR1* 依赖性)中。对突变的 *HMR-E* 沉默子进行实验表明, A 元件, 也许还有 RAP1 结合位点(E)都是 SIR1 作用于 *HMR* 时所必需的(Chien et al. 1993)。考虑到这一点, 我们认为有必要再提及一下, 核心 X 和 Y' 元件都含有 ARS 共有序列。X 和 Y' 元件间的连接处常由其他 $C_{1-3}A$ 重复序列组成(Louis & Haber 1992; Louis et al. 1994)。所以确定这些元件是否在天然端粒的沉默上发挥作用很有意义。特别强调一点, 我们应该知道这些元件是否可以提高或扩展 TPE, 如果答案是肯定的, 还要进一步分析这种效应是否依赖 *SIR1*。

端粒沉默的扩散与调控

尽管沉默是在端粒和 *HM* 沉默子元件中起始, 但是它对转录的影响还要求它向附近染色质作一定程度的扩散。考虑到染色体上基因的高密度和因此产生的非调控沉默所造成的危险(会导致重要或必要基因不适宜的阻抑), 可以想像在酿酒酵母中从端粒(和 *HM* 基因座)沉默染色质向外扩散的幅度受到严格的控制。我们还可能提出这样的假设: 端粒沉默的调控本身就是一种调节机制, 用以控制端粒基因的表达(Renauld et al. 1993)。尽管我们对这方面问题的理解很有限, 但是现有一些研究已经从定量角度揭示出沉默从端粒扩散的情况, 并已经开始揭示调控端粒沉默的机制。本章将主要介绍扩展的特点及其调控因子。

阻抑发生的概率从端粒开始快速而持续地降低并和启动子的强度有关

Renauld 等人(1993)利用 5-FOA-抗性试验, 测定在培养细胞中不表达端粒 $URA3$ 报道基因的细胞比例, 定量分析了从染色体末端开始的 TPE 扩散。作者构建了一系列菌株, 其中 $URA3$ 被置于接近天然染色体 V-R 端粒的 3 个不同的位点(每个位点都是双向的)。另外还建立了类似的菌株, 除去其中的 Y' 元件和一些邻近的序列, 使得同样的 $URA3$ 插入片段更加接近(新的)端粒。在所有这些菌株中, 正常的 $URA3$ 染色体拷贝发生突变。这导致形成 12 个株, 在这 12 株中, $URA3$ 启动子距端粒的距离不等(约 1~16kb)。考察这些菌株的培养细胞中出现 5-FOA 抗性的比例, 可以估测出特定端粒 $URA3$ 基因出现在沉默染色质区域的频率。该研究得出的最重要结果是: $URA3$ 基因阻抑发生的概率随启动子与端粒的距离增加显著而持续地下降, 从最近的构件向内(距端粒 1kb),

每 1kb 碱基大约降低 10 倍(见图 6-6),由此可以判定启动子与端粒的距离。根据这一结果,我们得出两个重要的结论:第一,因为距离和阻抑概率是指数关系(而不是线性关系),所以我们就可以认为端粒沉默是一个协同的过程,涉及到亚单位和(或)多组分的装配,这与果蝇中 PEV 的情况相似(Locke et al. 1988; Tartof et al. 1989);第二,沉默在很大的程度上依赖于启动子的距离,而不依赖于转录方向,于是可以推断沉默阻断了启动子本身的功能(而不是延伸性多聚酶的功能),所以它是在转录起始的水平发挥作用。下列结果也支持这一结论:对于测定的每个构建株,*URA3* 活化子(*PPR1*)的突变可以大幅度增加 5-FOA 抗性细胞的数量(至少达 500 倍)(见图 6-6)。这些早期的研究还得到很多有趣的观察结果,在 Y' 元件以及邻近序列存在时,可发现阻抑的距离增加了约 6kb(几乎与 Y' 元件长度相等)。目前还不清楚在 Y' 中缺少能抑制 TPE 扩散的 DNA 特殊序列元件,或者是这些元件自身是否能扩展或重新起始沉默。

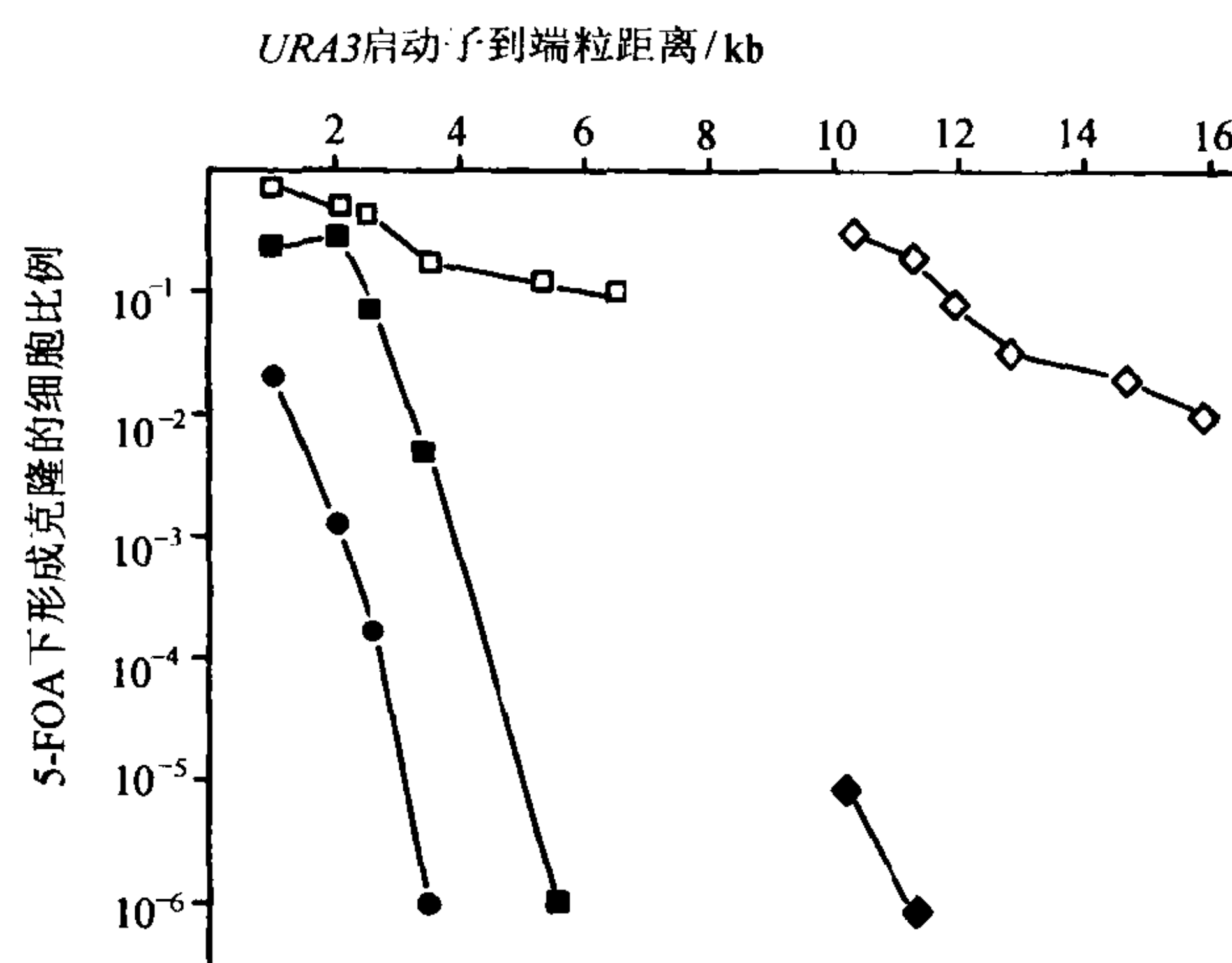


图 6-6 *URA3* 基因的端粒阻抑受到启动子与端粒间的距离、*PPR1* 活化子的存在以及 *SIR3* 基因剂量的影响
 实心圆代表 *PPR1*⁺ 菌株,其中 *URA3* 基因邻近缺乏正常染色体 V-R Y' 元件的人工端粒。实心方块代表这些菌株的等因位基 *ppr1*⁻ 衍生株,空心方块代表同一组 *ppr1*⁻ 菌株,该株还含有携带有高拷贝 (2 μ m) *SIR3* 基因的质粒。实心 (2 μ m 质粒) 和空心的 (2 μ m 质粒,带有 *SIR3*) 菱形代表一组 *ppr1*⁻ 菌株,其 *URA3* 基因位于天然染色体 V-R 端粒附近,图中的数据为不同实验结果的平均值。(引自 Renauld et al. 1993。)

沉默染色质从端粒进行扩散的限定性因子——*SIR3*

Renauld 等人(1993)利用上面提到的一组 *URA3* 端粒报道基因株,发现加大 *SIR3* 剂量(但不加大 *SIR2* 或 *SIR4*)后,会使被阻抑的端粒染色质内 *URA3* 端粒基因出现的频率显著上升。这种作用并不是说不需要 *SIR2*、*SIR4*、*NAT1*、*ARD1* 或者组蛋白 H4 氨基端,因此推测这种效应是通过端粒阻抑的正常机制实现的。

SIR3 的过度表达改变了 *URA3* 沉默与(启动子)距端粒间距离的函数曲线的斜率。

与此不同, *PPR1* (*URA3* 活化子) 的突变不会产生这种结果, 但增加了首次观察到 *URA3* 阻抑下降的距离。对这一结果的一种解释是, *SIR3* 的过度表达直接影响了沉默染色质的某种特点, 而不是影响 *URA3* 启动子, 这说明 *SIR3* 在端粒内受阻抑染色体的形成过程中起结构性作用。由于观察到的沉默的增加程度与 *SIR3* 基因的剂量成正比 (当该基因位于高拷贝数 $2\mu\text{m}$ 质粒中时的效果比在着丝粒质粒上的效果明显), 我们可以得出下列结论: 就端粒沉默而言, 细胞中 *SIR3* 蛋白是有限的。 *SIR3* 基因位于端粒附近, 因此 *SIR3* 的端粒阻抑可能被作为负反馈机制控制沉默染色质从端粒的扩散 (Ranauld et al. 1993), 而 *SIR3* 基因位于端粒附近则可增加这种可能性。该模型有待于实验检测。

端粒可以与 *HMR* 竞争限制沉默因子

有些令人意外的是, 对端粒沉默调控的深入了解主要来自于对 *HMR* 以及 *RAP1* 在此基因座沉默中的作用的研究。第一个直接证明 *RAP1* 在沉默中的作用的实验是分离出突变株 (*rap1⁻*), 该突变株中当 *HMR-E* 沉默子中含有突变的 A 元件 (ACS) 时, 导致 *HMR* 的去阻抑 (Sussel & Shore 1991)。 *rap1⁻* 突变, 所有 4 种类型均为发生在此蛋白羧基端的一个小区域内的错义突变 (见图 6-5B), 还可导致端粒 poly(C_{1-3}A) 片段的延长。延长的程度与它们对 *HMR* 沉默影响的严重程度有关。初步的研究表明 *rap1⁻* 突变体对于端粒沉默很少或没有影响, 这一结果与引起严重的端粒去阻抑的 *rap1⁻* 突变有明显的不同。对 *rap1⁻* 缺陷的本质的了解来自于双杂交系统中分离的 *RAP1* 相互作用因子基因 (*RIF1*) (见上文), *RIF1* 缺失引起的 *HMR* 沉默和端粒延长表现型与 *rap1⁻* 突变体的表型明显相似。而且, 将 *rap1⁻* 错义突变掺入到 G_{BD} -*RAP1* 杂交体中, 可以引起与 *RIF1* 双杂交相互反应的下降, 其程度与单个 *rap1⁻* 等位基因沉默缺陷的强度相关 (Hardy et al. 1992b)。这些结果导致了以下模型的建立, 该模型认为 *hmr Δ A* 沉默子的沉默需要 *RIF1*, 它通过与 *RAP1* 的蛋白-蛋白的直接相互作用而被吸引到沉默子上。

然而后来的研究对这一模型提出了疑义, 并有力地指出, *rap1⁻* 突变体的首要作用体现在端粒上。首先通过仔细检查 *rap1⁻* 和 *rif1* 突变即可清楚地发现, 它们可以加强端粒的沉默作用, 因为在这一突变体的培养细胞中有更大一部分细胞表现出端粒报道基因的阻抑 (Kyrion et al. 1993; Buck & Shore 1995)。所以, *rap1⁻* 和 *rif1* 突变在 *HMR* 和端粒沉默上有相反的作用, 使前者减弱, 后者加强。而且, 当 *rap1⁻* 蛋白质被定向到 *HMR* 基因座时 (利用 *GAL4* DNA 结合结构域杂合体), 发现它在沉默效果上好于相应的 *GAL4*-*RAP1* 野生型杂合蛋白 (Buck & Shore 1995)。这一令人吃惊的发现意义重大, 因为其他的实验结果表明, 染色体 *rap1⁻* 突变能够阻抑在 *HMR* 处的野生型 *GAL4*-*RAP1* 杂交体功能, 而不阻抑 *GAL4*-*rap1⁻* 杂合体。

这些结果又得到了另一种新的模型的诠释: 端粒和 *HMR-E* 沉默子竞争一个限制性成分。有人提出 *rap1⁻* 或 *rif1* 突变可以改变这种竞争, 使之有利于端粒。这样当位于沉默子的 ARS 元件突变后, 在 *HMR* 处的沉默就会被削弱或者消除。这种模型的最根本特点 (端粒-*HM* 基因座竞争) 可从实验中得到直接的证明: 通过和 *rap1⁻* 细胞遗传杂交可以产生含有延长端粒的 *rap1* 野生型细胞。在这样的细胞中, *HMR* 沉默减少, 而 TPE 加强。现在还不十分清楚 *rap1⁻* 或 *RIF1* 突变对 *HMR* 和端粒发挥相反效应的明确机制, 但很可能涉及到 *RAP1*-*SIR4* 相互作用的改变。在双杂交系统中, *GAL4*-*rap1⁻* 杂合体表现出与

SIR4-G_{AD}杂合体的相互作用明显增强。按这种 *RIF1* 功能的新的观点解释,人们认为 *RIF1* 蛋白质特异地与端粒 RAP1 结合,并抑制这些基因座吸引 SIR 复合体。尽管现在不清楚 *RIF1* 为什么不在 *HM* 基因座阻抑沉默,但是一种可能的原因是 *SIR1* 在这些位点上的作用超过了 *RIF1* 的负性作用。

尽管在 *rap1⁻* 或 *rif1* 突变体细胞中,存在端粒和 *HMR* 的竞争关系,但在野生型细胞中,染色体 III-R 端粒实际上可能促进了 *HMR* 的阻抑。当端粒异常延长时,情况也是如此。与 *HML* 相比,*HMR* 对组蛋白 H4 氨基末端突变造成的影响的异常抵抗,似乎主要是因为邻近端粒对 *HMR* 的效应造成的(Thompson et al. 1994a)。产生这种效应的机制尚不清楚,也不清楚这种效应为什么不发生在 *HML* 上。

转录活化因子是克服 *URA3* 基因的端粒阻抑所必需的

TPE 的动力学特性表明一定存在某种机制以保证端粒基因的转录状态可以改变。Gottschling 和他的同事(Aparicio & Gottschling 1994)已经开始探索这一问题,他们把酵母 *URA3* 基因当作模型系统,分析基因如何由沉默状态转变为活化状态。人们对 *URA3* 启动子已经有很深的了解,知道它在正常情况下要么处于基础状态要么处于活化的转录状态。然而当 *URA3* 位于端粒附近时,它可以达到一种新的阻抑状态,这与上述情况相同。主动转录状态需要 *PPR1* 基因的产物,即第三类锌指 DNA 结合蛋白质(Roy et al. 1990)。通过操纵细胞中 *PPR1* 活化蛋白的浓度,并检查端粒 *URA3* 的表达情况,我们可以得出很多有趣的结论。首先端粒沉默阻抑了 *URA3* 的基础转录。这一结论是根据如下的观察得来的:当 *PPR1* 由于突变而被去除后,端粒 *URA3* 基因完全失活。因此,需要 *PPR1* 活化蛋白来克服端粒沉默。反过来讲,增加 *PPR1* 的水平(可以通过将基因置于多拷贝质粒之中实现),能够阻止 *URA3* 的端粒阻抑。综合起来看,这些数据表明,当 *URA3* 活化子位于端粒附近时,活化子 *PPR1* 和端粒沉默装置间有竞争关系,以建立起 *URA3* 的转录状态。增加活化子的浓度有利于基因的表达,这与增加沉默装置中的一个组分(*SIR3*)的基因剂量有利于阻抑的情况相同(见上文)。这种活化子竞争现象也许很普遍,因为在 *PPR1* 结合位点被 *GAL4* 结合位点置换的构建株中,构建株对 *GAL4* 浓度变化产生反应。而且在这个人工系统中 *GAL4* 对端粒 *URA3* 的活化,依赖于明确的 *GAL4* 活化的结构域。

端粒 *URA3* 基因的活化依赖于细胞周期

端粒 *URA3* 的活化可能发生在细胞周期内的各个时间,或者只发生在某些阶段内。例如,在 DNA 复制过程中,阻抑的染色质结构可能部分地或全部地受到破坏。Aparicio 和 Gottschling(1994)为了区分这两种模型,构建了一些菌株,在这些菌株中以人工控制的方式(从可诱导的 *GAL1-10* 强启动子表达)产生 *PPR1* 的组成型活化形式 *PPR1^c*。在不同细胞周期阶段阻断细胞,检测端粒 *URA3* 的诱导情况。这些实验的结果表明 *PPR1* 能够激活停止于 G₂/M 期的细胞[用诺考达唑(nocodazole)],但不能激活处于 G₀ 期(通过饥饿)、G₁ 期(通过 α 因子)和 S 早期[通过羟基尿(hydroxyurea)]的细胞(Aparicio & Gottschling 1994)。在一个重要的对照组中,已经证明非端粒基因 *URA3* 在整个细胞的任一过程都可以被激活。从这结果中作者得出二个主要结论,首先,他们提出端粒沉默染色质一旦建立,就会形成相对稳定的结构,可以抵抗基因活化,但他们也指出这样的结构在

DNA 复制过程中被分解,在这一时刻,端粒沉默部分和基因活化因子相互竞争,以决定端粒基因的表达状态。基因的这种转录状态直到 G₂ 或 M 早期才被“固定”。

细胞周期的延迟可以加强端粒沉默的建立

对 *rap1*⁻ 突变的基因阻抑因子进行分析时发现,细胞周期突变对于在 *HMR* 和端粒处建立沉默的影响是我们未曾预见到的 (Laman et al. 1995)。如上所述,*rap1*⁻ 突变会改变 *HMR* 和端粒沉默间的平衡关系,结果使 *HMR-E* 沉默子的 A 位点突变时产生 *HMR* 的去阻抑以及端粒沉默的增加。这些 *rap1*⁻ 突变的阻抑因子叫做缺陷沉默阻抑因子 (Suppressor of defective silencing, *SDS*),它们已经被分离出来(其中 *hmrΔA* 的沉默能力已被恢复) (Sussel et al. 1993)。现发现这些阻抑因子很多都是正常细胞周期中所必需的基因的等位基因 (Laman et al. 1995)。例如,*SDS11* 与 *SW16* 是相同的,它是一个 *CLN* 基因的转录调节子;*SDS12* 与 *RNR1* 是相同的,它是 DNA 合成必需的核苷酸降解酶的调节亚基。这种阻抑现象看起来很普遍,因为很多细胞周期蛋白 (cyclin) 基因 (*CLN* 和 *CLB* 基因) 的突变和其他细胞周期转录调节因子 (*SWI4* 和 *MBP1*) 的突变,也会起到 *rap1*⁻ 阻抑因子的作用。由于 *rap1*⁻ 突变可能在 *HMR* 建立沉默的水平上发挥作用 (Sussel et al. 1993),那么细胞周期突变引起的阻抑就会以某种方式加强这个过程。下面的观察结果也支持这种结论:这些阻抑因子在 *sir1* 突变株(这在建立沉默时也是有缺陷的)中可以恢复 *HMR* 位点的沉默 (Pillus & Rine 1989)。

引人注意的是,检测的所有细胞周期突变也可以促进 TPE,表明它们也会加强端粒上的沉默建立过程,或者以某种程度方式稳定这种受阻抑的过程。现在人们提出两种模型来解释上述现象 (Laman et al. 1995)。第一个模型提出,所有这些突变可以造成细胞周期的延迟,这有利于沉默的建立。例如,它可以通过在 *HM* 基因座和端粒复制时延长 S 期的时间。如果此时活化子浓度下降或促进沉默的因子数量很大或活性很强,那么这种延时就会促进沉默状态的建立。另外细胞周期的突变还有更多的间接效应。所有的突变都会引起细胞体积增大,很有可能这种对细胞体积的影响会导致核内活化子或沉默因子浓度的变化,或两种因子浓度的共同变化。因为现在已经明确沉默(在 *HM* 基因座和端粒处)对于这两种类型因子的浓度非常敏感 (Renald et al. 1993; Sussel et al. 1993; Aporicio & Gottschling 1994),因此这种模式很有可能成立。

端粒在核周边的定位与 TPE

很多生物或细胞中,端粒似乎都聚集在一起,局限在核外周边 (Gilson et al. 1993a; Dernburg et al. 本书)。利用抗 RAP1 抗体在免疫荧光显微镜下观察,发现酵母中也有同样的现象 (Klein et al. 1992; Palladino et al. 1993)。那么,一个很明显的问题就是这种关系在端粒附近的基因位置效应阻抑上是否起一定的作用。为解释这个问题, Paldadino 等 (1993) 分析了两个 *SIR* 基因 (*SIR3* 和 *SIR4*) 突变对端粒结合、核的定位以及结构的影响。结果表明,如果 *SIR3* 或 *SIR4* 失去功能,则会减少端粒与端粒结合,以及在核外周的定位(用抗 RAP1 染色固定的原生质球加以判断),还会引起 poly(C₁₋₃A) 重复序列轻度缩短。如上所述,这两种突变都会导致 TPE 的全部丧失。所以在这种情况下核周边定位丧失与 TPE 丧失之间有一种非常明确的关系。最近的研究表明,截短 RAP1 的末端 28 或

165 个氨基酸都会改变 SIR3 的亚核定位,后者在野生型细胞中,一般聚集在核周边的位点上(Cockell et al. 1995)。这些结果和其他一些数据进一步说明, RAP1 将 SIR 复合体吸引到端粒上(Moretti et al. 1994),进一步强调了核周边定位和沉默的紧密关系。

染色质结构:组蛋白 H3、H4 的作用和沉默的分子模型

沉默染色质采用一种改变的染色质结构

一系列观察表明,位于 *HM* 基因座和端粒的沉默染色质的存在状态与非沉默染色质不同。证明该结论的第一个证据是:*HO* 内切核酸酶切割位点[位于表达的(*MAT*)和沉默的(*HM*)接合型基因座]在沉默基因座上是不能接近的(Strathern et al. 1982; Klar et al. 1984)。由于在沉默基因座上 *HO* 切除位点与受阻抑启动子的距离很远,这可能表明沉默的作用不具有启动子特异性,而是限制蛋白质接近染色质的某一区域。一个类似的阻碍酶接近的现象还见于 *HM* 基因座(通过检测对 UV 造成的损伤修复的反应)(Terleth et al. 1989, 1990)。这些观察结果表明,沉默是由某种形式的折叠或受到保护的染色质结构引起的,其中 DNA 比非沉默染色质更难接近。

对来自沉默的和受阻抑的接合型基因座染色质进行微球菌核酸酶和 DNA 酶 I 的酶切研究,进一步证明了染色质结构变化的设想,因为在 *HM* 和 *MAT* 基因座间存在 SIR 依赖性差异(Nasmyth 1982)。最近,这方面的研究已经有了深入。实验表明,当大肠杆菌 *dam* 甲基化酶在酵母中表达时,可以使染色体 GATC 位点甲基化。两组实验中已经表明在 *dam* 甲基酶接近性上存在的 SIR 依赖性的差异可以在 *HM* 基因座和端粒处见到,这再一次表明这些沉默基因座采用一种改变了的染色质构象(Gottschling 1992; Singh & Klar 1992)。对分离出的细胞核进行限制性内切核酸酶消化,可以绘出 *HMR* 染色质内部或周围的 SIR 依赖性保护位点(Loo & Rine 1994)。利用这种体外方法,人们设计出一个巧妙的实验,用特异性内切核酸酶进行酶切证明,当侧翼沉默子不同时存在于同一个 DNA 分子上时,仍然可以维持 *HMR* 中心区的保护作用(Loo & Rine 1994)。这一重要的结果表明体内沉默的维持可能无需连续的沉默子功能。另外,这些实验表明,沉默染色质在溶解状态下还是稳定的,因而无须附着在核膜上。利用这种体外系统做进一步研究,可能会了解到沉默染色质的生物化学成分和结构,并最终使这方面的问题得以解决。

利用完全不同的方法我们可得出相似的结论。这种方法利用汞亲合色谱方法区分“开放”和“关闭”的染色质(Chen-Cleland et al. 1993)。在这些实验中,设计一个酵母株来表达一种组蛋白 H3 的拷贝。这种蛋白中在第 110 个氨基酸位点处含有半胱氨酸。在高等真核生物细胞中,不在酵母中,这个位点是丙氨酸。进行汞亲合色谱实验发现,活化基因的染色质主要见于结合部分,即使实际在制备染色质时基因没有被活化转录也是这样。然而在 SIR 细胞中,沉默接合型基因座主要存在于非结合部分中,但在 *sir3* 突变株中存在于结合部分(未检查端粒染色质)。利用上述酶解实验也得出同样的结果,现还不十分清楚这些系统可以检查到什么样的结构差异。

组蛋白 H4 和 H3 在沉默中的特殊参与作用

现发现酵母中组蛋白 H4 高度保守的氨基端尾部的突变可以引起 *HM* 和端粒沉默的

降低,但对细胞生长只有轻度的影响,这些发现是组蛋白在沉默中具有独特作用的第一个遗传学证据(Kayne et al. 1988;Megee et al. 1990;Park & Szostak 1990;Aparicio et al. 1991)。这些早期的实验结果得到了 Grunstein 实验室的进一步补充,使我们更加充分地了解了组蛋白 H3 和 H4 氨基末端尾部的特定区域和氨基酸在沉默中的作用(Thompson et al. 1993)。这些研究概括如下。

组蛋白 H4

组蛋白 H4 氨基端在沉默中似乎比组蛋白 H3 同源区域起着更大的作用。对突变进行深入的分析发现,在 H4 氨基端有两个区域是 *HM* 基因座沉默所必需的,R1 区域为基础区域,含有第 16~19 个氨基酸(Johnson et al. 1990);另一个 R2 为非基础区域,含有第 21~29 个氨基酸(Johnson et al. 1992)。这两个区域的单点突变都会引起 *HML* 阻抑丢失,而不影响 *HMR*。这可能是因为附近染色体 \square -R 端粒的效应造成的(Thompson et al. 1994a),而不是因为在这两个基因座组蛋白作用间有本质的不同。替换 R1(Aparicio et al. 1991)和 R2(Thompson et al. 1994b)这两个区域,对端粒有很强的去阻抑作用。通常来说改变 R1 区域净电荷的突变对 R1 区域的影响更严重。R2 区域的情况则有很大的不同,在此脯氨酸替换会产生严重的影响,这与该区域结构形成 α 螺旋的观点相一致。这两个区域的突变可受到 *SIR3* 点突变的阻抑(Johnson et al. 1990),这支持了 *SIR3* 蛋白质与 H4 氨基末端直接相互作用的观点。然而,*SIR3* 的阻抑因子突变看起来不表现出等位基因特异性,因此无法确定 *SIR3* 和组蛋白 H4 间的直接作用区域(见下文)。

组蛋白 H3

尽管 H3 氨基末端尾部与 H4 的尾部很相似,主要表现在高度碱性,含有很多能够进行可逆乙酰化反应的赖氨酸残基,但 H3 似乎在沉默上起着较次要的作用(Thompson et al. 1994b)。组蛋白 H3 中 4~30 个残基的缺失会引起 *HML* 轻度去阻抑。当同时伴有 *sir1* 突变时,这种现象将会加强。同样的缺失对 *HMR* 没有影响,但如果同时伴有组蛋白 H4 的 Lys-16 突变(见下文),就会导致该基因座的明显去阻抑。然而,H3 组蛋白的这种缺失甚至是更少的缺失本身就会引起端粒 *URA3* 基因的大幅度去阻抑。

沉默过程中的组蛋白乙酰化

正如上面提到的那样,组蛋白 H3 和 H4 氨基酸末端尾部都有一个共同的特征,即都有在体内易于进行可逆乙酰化反应的赖氨酸残基(van Holde 1989)。来自其他系统的重要证据表明,特定 DNA 序列或染色体区上组蛋白乙酰化模式与其转录状态相关。例如在四膜虫的转录活跃巨核中,组蛋白 H3 和 H4 大多存在高过乙酰化(hyperacetylated),而那些转录不活跃的微核则大多存在低乙酰化(hypoacetylated)(Lin et al. 1989)。基因的活性与高过乙酰化的相关性也见于鸡红细胞染色质(Hebbes et al. 1988)。在整个染色体水平上,与组蛋白 H4 的特殊乙酰化形式结合的抗体显示存在着不同的异构形式(Turner et al. 1992)。特别是在果蝇染色体着丝粒的异染色质中,H4 在 K12 位点乙酰化现象非常突出,而常染色体区的 H4 特别易在 K5、K8 位点乙酰化。最后,特别易于在 K16 点上乙酰化的 H4 与雄幼虫中 X 染色体的活跃转录有关。尽管对于组蛋白乙酰化和转录间的

这种关系不清楚,但是体外的研究已经表明,组蛋白乙酰化可以改变核小体核心 DNA 的相互作用(Norton et al. 1989)。因此我们有理由相信,机体可运用不同程度的乙酰化作为调节机制,以利于特定的染色质结构和转录状态。

遗传学和生物化学方面的两个证据表明,组蛋白乙酰化在 *HM* 基因座和端粒的转录沉默中具有特定的作用。如上所述,如果含有乙酰化赖氨酸的组蛋白 H3 和 H4 在某些区域受到突变的影响,就会出现沉默缺陷。在组蛋白 H4 中,氨基端在阻抑作用中起着比 H3 更大的作用。这方面已有了详细的研究(Johnson et al. 1990,1992;Megee et al. 1990;Park & Szostak 1990)。通过大量单一或多点突变的检查,清楚地表明了 H4 的 16 位点上的赖氨酸在沉默中的关键作用。K16 赖氨酸突变成精氨酸(拟非乙酰化状态)对于阻抑的作用很小,而该残基如果变成了丙氨酸、甘氨酸或谷氨酰胺(拟乙酰化状态)就会引起沉默的显著丢失。与此相反,位点 5、8、12 中可乙酰化的赖氨酸突变成甘氨酸或丙氨酸后对于沉默没有太大影响,甚至各位点同时发生突变也无很大影响。于是我们可以得出结论:H4 组蛋白 16 位的赖氨酸必须以非乙酰化状态存在,才能实现沉默。这一结果与果蝇中观察到的结果完全相同,后者表现为,对于在雄性而言 H4 分子的 K16 乙酰化与高转录活性的 X 染色体具有特异相关性。

抗组蛋白 H4 尾部的乙酰化形式的特异性抗体已经被用来探测酵母基因组中与特定序列相关的核小体的组成(Braunstein et al. 1993)。利用这样的抗体进行免疫沉淀实验,结果发现:与相同的(表达的)*MAT* 序列相比,沉默染色质(来自于 *HM* 基因座)未出现在乙醛固定后核小体的沉淀物中。在 *sir* 突变体细胞所产生的核小体中,这种差别已经消失,表明其原因是转录沉默的结果。同样的依赖于 *SIR* 的差异还见于端粒序列。人们认为这些数据说明沉默染色质在组蛋白 H4 的乙酰化形式上是有缺陷的(Braunstein et al. 1993),这种解释与上述的突变研究结果一致,至少就 K16 残基而言是一致的。还应该指出,我们还不清楚这些结果是否反映出如作者所说的沉默与活性染色质之间的不同的乙酰化模式,或者两种染色质对抗体有不同的接近形式。然而作者找到了一个独立的证据,说明乙酰化的特殊作用,他证明 *SIR2* 基因的过度表达会导致大量核小体的乙酰化不足。于是有人提出这样的假设 *SIR2* 可能自身就是组蛋白去乙酰化酶,或者可以调节乙酰化/去乙酰化过程。

组蛋白 H3、H4 与 SIR3、SIR4 的相互作用:一种正在形成的酵母沉默染色质组装分子模型

上述遗传和生物化学实验为我们提出了新的问题:在沉默染色质中组蛋白 H3 和 H4 氨基端尾部是否与特异蛋白质或一组蛋白质相互作用?如果这样的话,这些蛋白质又是什么呢?Grunstein 从实验中得出了一个特别令人满意的答案(Hecht et al. 1995)。利用组蛋白尾部已融合到谷胱甘肽-S 转移酶(GST)的杂合蛋白,作者证明,H3 和 H4 组蛋白的尾部[GST-H3(1~46)和 GST-H4(1~34)]与 SIR3 和 SIR4 蛋白质(在网织红细胞裂解酶中合成)间有蛋白质的相互作用。几个证据表明,这些反应具有特异性,且和体内沉默染色质的组装有关。首先,尽管所有的组蛋白氨基端尾部都带高电荷,但是 SIR3 和 SIR4 只与组蛋白的 H3 和 H4 氨基末端发生反应,而与 H2A 和 H2B 不发生反应。这一结果与如下的遗传学结果是一致的:H3 和 H4 氨基末端在 TPE 和 *HM* 基因座的沉默上起着重要

的作用(Kayne et al. 1988;Thompson et al. 1994b);其次,上述观察到的相互作用明显地不是由 DNA 介导的,因为它们不受溴化乙锭的影响(已知后者可以阻碍蛋白质与 DNA 间的相互作用);最后,体外组蛋白结合需要 SIR3 序列,同样,体内的沉默也需要这样的序列。

进一步的研究表明(Hecht et al. 1995),特定组蛋白突变体的沉默表型与相应突变体蛋白质与 SIR 蛋白质在体外结合有一定的关系。例如 H3 和 H4 构建株,含有遗传学上明确的沉默区域[GST-H3(1~25)和 GST-H4(15~34)],保留着与 SIR3、SIR4 相互作用的能力,而在该区域外的碱性区域[GST-H3(21~46)和 GST-H4(1~16)]则很少或没有与 SIR3、SIR4 相互作用的能力。H4 的 16、17、19 和 20 点上关键带电残基被谷氨酸和甘氨酸替换后,也能影响 SIR3 和 SIR4 的结合能力,但 H18 甘氨酸替代后影响似乎不大。作者认为在 H4 中,前者的残基全部落在假定的 α 双螺旋一侧(Johnson et al. 1992),这可能会与 SIR3 和 SIR4 相互作用,而 H18 残基位于对侧面,与核小体 DNA 接触(Ebraldse et al. 1988)。同样,脯氨酸替换 H4 R2 区域内的 I21 和 D24 后,对 SIR 结合只有轻度的影响,表明这个亚区域在沉默上也起着不同的作用。有趣的是,尽管 H4 中 K16Q 突变对 SIR3 结合本身无影响,但如果同时有第 4~14 个氨基酸缺失或者在 K5、K8、K12 被甘氨酸替代,则 SIR3 结合消失。附近赖氨酸残基对 K16Q 突变的阻抑似乎只发生在体外。按 Hecht 等人(1995)的推论,这可能是因为 K12 异染色质特异性乙酰化所致(Turner et al. 1992)或者是由于在 H4 组装到正在复制的染色质时发生二乙酰化所致(Chicoine et al. 1987)。与这一设想相同,K5、K8 和 K12 突变成精氨酸后(突变后可以保持这些位点的正电性),可促进含有 K16Q 突变的菌株中的沉默。

RAP1 可以与 SIR3 和 SIR4 相互作用(Moretti et al. 1994),SIR3、SIR4 可以与 H3、H4 氨基末端相互作用,综合这些观察结果,可以得出一个端粒异染色质的组装模型(Hecht et al. 1995)(见图 6-7)。根据这一模型,RAP1 与 $C_1\sim_3A$ 重复序列结合后通过将 SIR3、SIR4 蛋白质复合体吸引到端粒上启动 TPE。接下来,SIR3 和 SIR4 的相互作用(Chien et al. 1993,Moretti et al. 1994)将这种复合体扩展到端粒的重复序列之外,这是

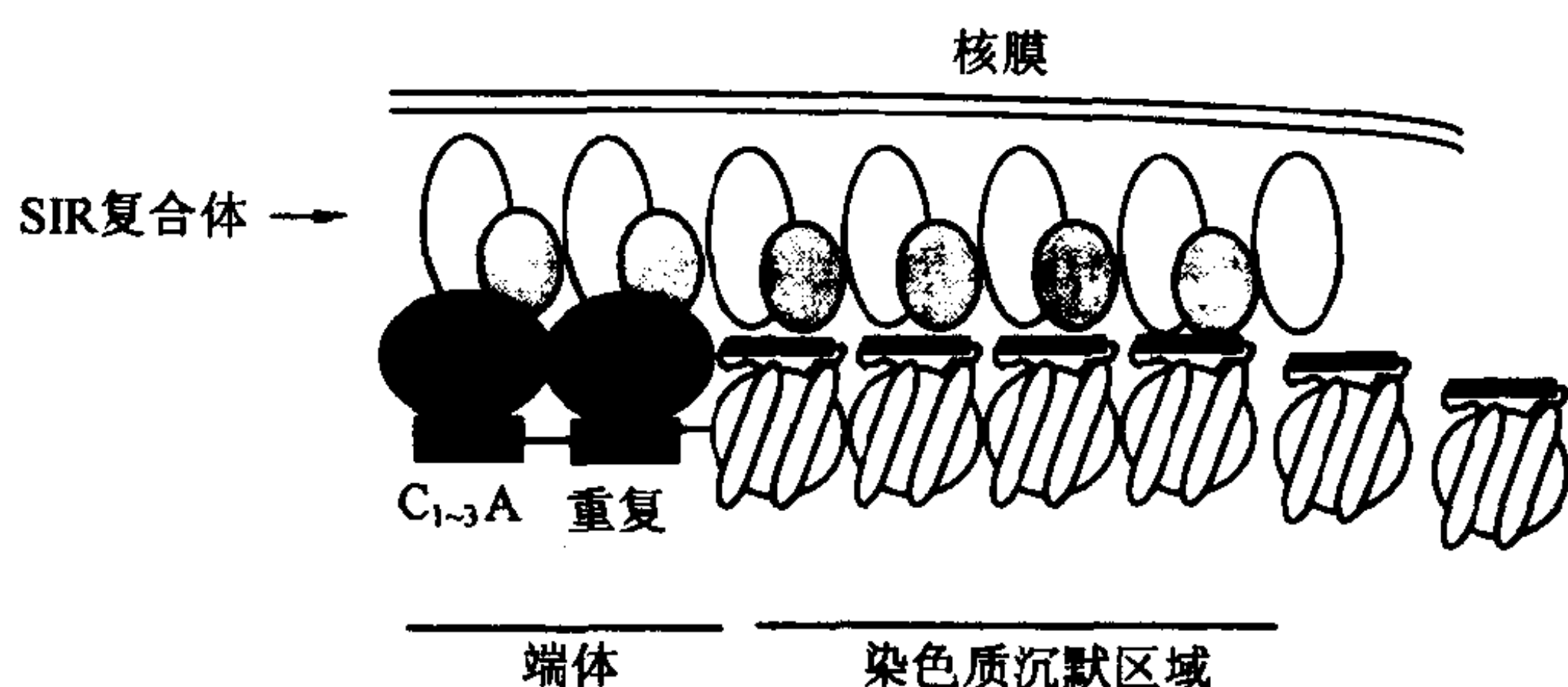


图 6-7 一个用于解释酵母端粒沉默的假想模式

该模型的根本特点是①通过与 RAP1 的相互作用,将 SIR3-SIR4 复合体(大、小椭圆形)吸引到端粒上;②复合体通过 SIR3-SIR4 的相互和 SIR 与组蛋白的相互作用扩散到附近的染色质上。组蛋白 H3 和 H4 氨基端尾部以小长方形标出,图中示出整个复合体通过与 SIR4 相互作用附着在核膜上。详见正文讨论。

通过与组氨酸 H3、H4 氨基末端尾相互作用实现的。以这种方式, SIR3 和 SIR4 复合体在染色质上聚合。在此协同过程中, 有很多弱的蛋白质间的相互作用(包括 SIR 蛋白质与组蛋白 H3 和 H4 尾部的相互作用、SIR 蛋白本身的相互作用)。SIR3-SIR4 复合体对核小体的“包裹”本身就足以通过限制转录因子接近 DNA 模板而导致沉默。

这一模型尽管还处在推测水平, 但已可以解释 TPE 的很多基本特性。首先, 如果需要大量 RAP1-SIR 相互作用才能启动(或集结) SIR-组蛋白受阻抑的染色质结构的组装, 那么 TPE 的特异性(含有 SIR 蛋白质复合体的染色质区域)就由 RAP1 决定。TPE 的扩散被认为是 SIR-组蛋白复合体后续组装的结果(该过程无须与 RAP1 相互作用), 实际上可以引起附近染色质的沉默。这种协同聚合过程可以预期 TPE 对 *SIR3* 基因剂量的敏感性(von Hippel et al. 1982), 而且 TPE 从染色体末端向内扩展程度最终会受到其基本结构成分, 特别是 SIR3 是否存在的限制(Renauld et al. 1993), 如图 6-7 所示。最后, 启动子强度和组装一个受阻抑的染色质结构的可能性之间的关系, 可以被看成是 DNA 结合活化子蛋白和 SIR-组蛋白复合体竞争靠近启动子序列。这种在染色质复制时可能就开始的竞争, 解释了为什么重建沉默需要通过 S 期(Miller & Nasmyth 1984), 而且这种竞争可能一直持续到在细胞周期的后期(此时一种转录状态或另一种转录状态变得固定)为止(Aparicio & Gottschling 1994)。很明显, 需要利用更加接近细胞内复杂情况的体外环境, 对这种模型进行进一步的生物化学实验检验。

现在还值得强调一下, TPE(和 *HM* 沉默)的一些特性或者尚不清楚, 或者根本不能用这个模型简单地加以解释。首先, *SIR2* 的作用(它是这两个系统所必需的)现在还没得到解决。一个比较合理的假说是 *SIR2* 蛋白质与假设的 SIR3-SIR4 复合体相互作用(Moretti et al. 1994), 并且直接或间接促进局部组蛋白的去乙酰化(Bramstein et al. 1993), 这被认为有利于受阻抑染色质的组装。然而这种模型的任何一方面都没有直接的生物化学基础。其次, 现在还不清楚到底 *HM* 沉默子如何利用 *SIR1*, 又如何在这些基因座更有效地引起 SIR3-SIR4 复合体的组装。现有的资料表明这一过程发生在竞争限制沉默因子(*SIR4* 或其他蛋白质)的水平, 涉及到 *HM* 特异性沉默因子, 如 ORC 等。另外还受 RIF1 的影响, 后者可能对端粒内沉默染色质的组装进行负调控。然而这些不同调节形式的机制还有待于进一步研究。第三, 在 TPE 和 *HM* 沉默中其他因子(如 SUM1 和 NAT1/ARD1 氨基末端蛋白转乙酰酶)的作用还不清楚。第四, 核内定位的重要性或者与核膜的精确附着情况, 还有待于进一步确定。例如, 核膜的附着很有可能在沉默染色质结构的形成中起着直接的重要作用, 或者其自身就足以使染色质不能接近参与转录或重组的酶。另一种可能是, 核附着可以加快沉默染色质的启动或随后的组装, 而不直接决定其结构。这些问题强调了理解沉默染色质精确结构的重要性, 这些问题的解决当然是生物化学中最富有意义的挑战。

酵母 TPE 的生物学

自从 TPE 被发现以来, 尽管几年来我们获得了有关其机制与调节的大量详尽的分子信息, 但是酵母细胞中这种现象的生物学意义仍然不清楚。首先, 受 TPE 影响的酵母基因尚未确定。如上所述, 很多端粒中 Y' 重复序列元件自身被转录(Louis & Haber 1990,

1992), 因此可能产生出一种机制, 允许它们避开 TPE。与端粒相关的其他重复序列(例如 *MAL* 和 *SUC* 基因座)也可以被转录, 而且也不受 TPE 影响(Carlson et al. 1985; Michels et al. 1992)。 *SIR2*、*SIR3* 和 *SIR4* 处的突变将导致 TPE 的消除, 而对细胞生长没有明显影响, 这说明与基因调节相关的端粒沉默的生物学功能很可能十分微弱, 没有特异性强或极度敏感的实验方法是无法检测到的。随着越来越多的酵母染色体序列的测定, 以及对端粒附近基因的组构和转录属性的深入了解, 我们就会逐渐地理解 TPE 的生物学功能。

一种可能是, TPE 的进化是为了保护端粒不受染色体末端或附近的主动转录可能带来的不良影响。实际上染色体的稳定性在 *RAP1* 过度表达(Conrad et al. 1990)和 *SIR3* 及 *SIR4* 突变的影响而略有下降(Palladino et al. 1993)。然而, 这种效应不可能是由于 TPE 本身的丢失, 因为利用可诱导启动子对标记的端粒主动转录, 可以解除邻近 *URA3* 基因的 TPE, 但不会降低染色体的稳定性(Sandell et al. 1994)。随着我们对酵母端粒的复制和端粒在染色体复制、分离中的作用的深入了解, TPE 与这些过程的关系就会变得更为明确。

最近人们对酵母衰老进行了研究, 发现了沉默在决定细胞寿命中有着奇怪的、令人不解的作用(Kennedy et al. 1995)。如上所述, *SIR4* 的特殊等位基因(*sir4-42*, 在从羧基算起第 121 个残基, 即氨基酸 1237 处截短)可以增加平均寿命, 而且还加强了应激抗性, 后一种特性也可由 *SIR4* 无义突变产生, 但是寿命的增长则与之无关。事实上, *SIR4* 缺失实际上降低了酵母寿命。很明显, *sir4-42* 突变表现出 TPE 和 *HM* 沉默的消失(这两种沉默为隐性表型)。与此同时表现出对细胞寿命有影响的获得性功能。*sir4-42* 对寿命的作用肯定不是功能的变化, 因为它需要有野生型的 *SIR2* 和 *SIR3*(而不是 *SIR1*)的功能。这一结果已从以下模型角度作出解释, 该模型认为 *SIR2-4* 复合体可以阻抑一种与抗应激或衰老有关的至今尚未确定的基因。*SIR4* 无效突变或 *sir4-42* 突变被认为可以引起应激抗性所需基因的去阻抑, 这种基因可能位于端粒附近。*sir4-42* 突变被认为可以增加引起衰老的基因阻抑, 办法是通过从端粒(*HM* 基因座)上释放 *sir2-4* 复合体, 使之在假定的衰老基因处的作用更有效。通过过度表达 *SIR4* 羧基末端也可以达到同样的效果。如上所述, 这种现象被认为是介导沉默染色质附着在核膜上。这一模型的总观点是, 有限数量的 *SIR* 复合体分配到不同沉默基因座是受到严格调控的。上述的有关 *SIR1* 在 *HM* 基因座的作用、*rap1⁺* 和 *rif1* 突变的相反效应或 *HMR* 和端粒的相反效应的研究都支持这一观点。对寿命调节的进一步研究, 特别是对于参与衰老和应激反应的假定靶基因的鉴定, 将有利于我们理解沉默的生物学作用。

DNA 复制起始点上的 TPE

除对基因转录发挥局部的位置效应以外, 现在已经有很充分的资料表明, 端粒对 DNA 复制也表现出位置效应。端粒在酿酒酵母染色体上为后期复制区(late-replicating)(McCarroll & Fangman 1988), 而且至少有些情况下, 这是在 S 期端粒附近区域的复制起始点活跃相对晚的结果(Ferguson et al. 1991)。有迹象表明这是因为 TPE 所引起, 因为当置于质粒上时, 后期端粒的起始点(*ARS501*)在 S 早期被激活, 而早期复制起始点 *ARS1* 在被置于染色体 V-R 端粒附近、*ARS501* 周围时, 则复制很晚(Ferguson & Fang-

man 1992)。另外,将早复制区移向端粒后,会使这一区域的复制推迟(Ferguson & Fangman 1992)。一个需要回答的重要问题是,是否部分或全部的 TPE 所需的同种因子(例如 *RAP1*、*SIR2*、*SIR3*、*SIR4* 和 H4 氨基末端尾巴)也是 TPE 激活复制所必需。我们还应注意到 ORC 本身不仅对于 *HM* 基因座上的沉默也起着重要的作用,而且还在复制起始点活化过程中起着重要作用(Bell et al. 1993; Foss et al. 1993; Li & Herskowitz 1993; Micklem et al. 1993)。ORC 这两种功能的相关程度到底如何? 弄清这个问题是十分有意义的。从更广义的角度讲,我们还不清楚 DNA 复制的定时与转录活性的因果关系,而这种关系很有可能在真核生物中广泛存在(Goldman et al. 1984)。对酵母 TPE 的研究将有助于我们找到这方面的线索。

其他生物的 TPE 和异染色质

裂殖酵母也表现出 TPE 现象,并有很多芽殖酿酒酵母中所具有的相同特点(Nimmo et al. 1994)。在酵母中两个位于端粒附近的不同基因(*ura4* 和 *ade6*)的表达是花斑样的。而且阻抑发生的概率随着基因和端粒距离的加大而下降。在这种酵母中的着丝粒内也可以见到相似的 PEV 效应(Allshire et al. 1994)。裂殖酵母同样有沉默的接合型基因,现已确认出 6 种基因(*clr1⁺*、*clr2⁺*、*clr3⁺*、*clr4⁺*、*rik1⁺* 和 *swi6⁺*),均可能参与其阻抑过程(Egel et al. 1989; Thon & Klar 1992; Ekwall & Ruusala 1994; Lorentz et al. 1994)。这些基因中的几个突变对着丝粒的沉默有很强的效应,而对 *ura4⁺* 的端粒阻抑效应,尽管很弱,但还是可以被检测出来的(Aushire et al. 1995)。因为这些基因对两个沉默接合型基因座的阻抑效果有不同的影响(Ekwall & Ruusala 1994),因此着丝粒和端粒对它们突变体等位基因表现出不同的反应就不足为奇了。也许裂殖酵母中的沉默过程包括了反式作用调节子和一些蛋白质不同组合,这些蛋白质在特定的位点上发挥更重要的功能。这与在酿酒酵母中的情况不同,在那里只有 *SIR1* 基因可能专门作用于一种沉默基因座(*HM*)。要澄清裂殖酵母的有关问题需要对这种生物的位置效应进行彻底的遗传分析。

看来 TPE 是大部分(即使不是全部)真核生物的共有现象。事实上 TPE 首先发现于果蝇,人们首先在这里发现白眼基因由 P 元件介导转移到端粒附近,引起复眼彩色斑点表型,这与基因的花斑阻抑相一致(Hazelrigg et al. 1984; Levis et al. 1985)。这样,甚至在端粒结构比较特殊的生物体内(Pardue 本书),都有端粒异染色质化存在,并对邻近基因表现出花斑样位置效应(Karpen & Spradling 1992)。这个领域中一个特别令人兴奋的进展就是人们开始注意到果蝇体内由异染色质诱导的 PEV 与调节系统有关,该系统在发育期间决定着同源异型基因的稳定阻抑。

酿酒酵母的 TPE 和果蝇的异染色质之间究竟有多大的联系? 酵母端粒与异染色质确实有几个共同的特征,包括晚期复制和对基因表达表现出的位置效应(Eissenberg 1989; Henikoff 1990; Spradling & Karpen 1990)。酵母中 TPE 也对某些调节子的基因剂量表现出很强的敏感性(Renauld et al. 1993),这是果蝇中 PEV 的一个极为突出的特点。通过对酵母中组蛋白 H3 和 H4 突变体的研究已经证实了它对染色质结构的影响(见上文),而且这种影响也可能涉及到果蝇,因为已经观察到组蛋白基因剂量影响了果蝇的 PEV(Moore et al. 1979, 1983)。然而没有一种酵母 SIR 蛋白质与已知果蝇的位置效应增强子有任何

的相似性[如 Su(var)2~15(HP1)或 Su(var)3~7],与负性同源异型基因调节子(如 polycomb)等也没有相似性(Alberts & Sternglanz 1990)。值得注意的是,这些果蝇蛋白质中有两种(HP1 和 Polycomb)共同享有一个保守区域(染色区域)。该区域在很多哺乳动物及植物蛋白中存在(Sigh et al. 1991),也在裂殖酵母接合型调节子 *swi 6⁺* (Lorentz et al. 1994)中存在,可能直接参与果蝇内阻抑性异染色质结构的形成(Eissenberg et al. 1990; Paro & Hogness 1991; Paro 1993)。目前,酵母细胞很有可能利用完全不同的分子机制形成异染色质功能相关的形式。或许这种差别与酵母中 H1 蛋白质的缺乏有某种关系。然而,在我们对这两种生物体内的染色质结构有更多的了解之前,我们还不能确定出这种差别的重要意义。

果蝇中异染色质形成的根本机制现在还有很大的争议。尽管人们对位置效应中所涉及的染色质结合蛋白质进行细胞学观察,并在最近完成了鉴定,进一步支持了染色质结构连续向“高级有序”转变的模型,但人们也注重到其他可能性,包括核组构形式(Karpen 1994)和染色体配对(Henikoff 1994)。很有可能存在几种不同的机制分别或共同作用促进果蝇异染色质的形成和 PEV。而且还应考虑在酵母中的可能性问题,其中端粒的聚集和定位在核的周边以及折叠染色质结构的组装都可能和 TPE 有关。

结束语

酿酒酵母中的端粒对于转录有可逆的位置效应,这与多细胞真核生物中观察到的 PEV 有很多共性。酵母中端粒阻抑机制与接合型基因沉默有着密切的联系,对两个系统的研究已经提出了可以解释其基本特性的可能的分子模型轮廓。端粒的沉默由端粒结合蛋白 RAP1 启动,它可以通过特殊的蛋白间的相互作用将 SIR3 和 SIR4 吸引到染色体末端上。看起来很可能 SIR 蛋白质沿着附近的染色质进行组装,利用自身相互作用和与组蛋白 H3、H4 氨基末端尾部的特异性相互作用的网络,形成一个闭合的、无活性的染色质结构。端粒沉默的精确的分子机制需要深入的遗传学和生物化学分析作补充。对于这一系统的理解特别为我们提供了一幅异染色体结构及组装机制的清晰画面,而且对更为复杂的多细胞真核生物内的相关现象有着重要的意义。

致谢

感谢 V. Zakian 和 M. Grunstein 提供未出版的手稿;感谢 Drs. G. Lucchini 和 P. Plevani(米兰大学)在本章撰写过程中所给予的帮助;感谢国家卫生署(GM-40094)和美国癌症协会(VM-63A)对本实验室研究的资助。

参考文献

- Abraham, J., K.A. Nasmyth, J.N. Strathern, A.J.S. Klar, and J.B. Hicks. 1984. Regulation of mating-type information in yeast. *J. Mol. Biol.* **176**: 307-331.
- Alberts, B. and R. Sternglanz. 1990. Chromatin contract to silence. *Nature* **344**: 193-194.
- Allshire, R.C., J.-P. Javerzat, N.J. Redhead, and G. Cranston. 1994. Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* **76**: 157-169.
- Allshire, R.C., E.R. Nimmo, K. Ekwall, J.-P. Javerzat, and G. Cranston. 1995. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev.* **9**: 218-233.
- Aparicio, O.M. and D.E. Gottschling. 1994. Overcoming telomeric silencing: A *trans*-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev.* **8**: 1133-1146.
- Aparicio, O.M., B.L. Billington, and D.E. Gottschling. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**: 1279-1287.
- Astell, C.R., L. Ahlstrom-Johesson, M. Smith, K. Tatchell, K.A. Nasmyth, and B.D. Hall. 1981. The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **27**: 15-23.
- Bell, S.P. and B. Stillman. 1992. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**: 128-134.
- Bell, S.P., R. Kobayashi, and B. Stillman. 1993. Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science* **262**: 1844-1849.
- Berman, J., C.Y. Tachibana, and B.-K. Tye. 1986. Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 3713-3717.
- Boeke, J.D., J. Trueheart, G. Natsoulis, and G.R. Fink. 1987. 5-Fluoro orotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154**: 164-175.
- Brand, A.H., G. Micklem, and K. Nasmyth. 1987. A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation. *Cell* **51**: 709-719.
- Brand, A.H., L. Breeden, J. Abraham, R. Sternglanz, and K. Nasmyth. 1985. Characterization of a "silencer" in yeast: A DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* **41**: 41-48.
- Braunstein, M., A.B. Rose, and S.G. Holmes. 1993. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Gene Dev.* **7**: 592-604.
- Broach, J.R., Y.-Y. Li, J. Feldman, M. Jayaram, J. Abraham, K.A. Nasmyth, and J.B. Hicks. 1982. Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**: 1165-1173.
- Buchman, A.R. and R.D. Kornberg. 1990. A yeast ARS-binding protein activates transcription synergistically in combination with other weak activating factors. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 887-897.
- Buchman, A.R., N.F. Lue, and R.D. Kornberg. 1988a. Connections between transcriptional activators, silencers, and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5086-5099.
- Buchman, A.R., W.J. Kimmerly, J. Rine, and R.D. Kornberg. 1988b. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 210-225.
- Buck, S.W. and D. Shore. 1995. Action of a RAP1 C-terminal silencing domain reveals an underlying competition between *HMR* and telomeres in yeast. *Genes Dev.* **9**: 370-384.
- Carlson, M., J.L. Celenza, and F.J. Eng. 1985. Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2894-2902.
- Chan, C.S.M. and B.-K. Tye. 1983a. A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replicating sequences that have very similar genomic environments. *J.*

- Mol. Biol.* **168**: 505–523.
- . 1983b. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**: 563–573.
- Chen-Cleland, T.A., M.M. Smith, S. Le, R. Sternglanz, and V.G. Allfrey. 1993. Nucleosome structural changes during derepression of silent mating-type loci in yeast. *J. Biol. Chem.* **268**: 1118–1124.
- Chicoine, L.G., R. Richman, R.G. Cook, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 1987. A single histone acetyltransferase from *Tetrahymena* macronuclei catalyzes deposition-related acetylation of free histones and transcription-related acetylation of nucleosomal histones. *J. Cell Biol.* **105**: 127–135.
- Chien, C.-T., P.L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. 1991. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9578–9582.
- Chien, C.-T., S. Buck, R. Sternglanz, and D. Shore. 1993. Targeting of SIR1 protein establishes transcriptional silencing at *HM* loci and telomeres in yeast. *Cell* **75**: 531–541.
- Cockell, M., F. Palladino, T. Laroche, G. Kyrion, C. Liu, A.J. Lustig, and S.M. Gasser. 1995. The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: Evidence for a multi-component complex required for telomeric silencing. *J. Cell Biol.* **129**: 909–924.
- Conrad, M.N., J.H. Wright, A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: Overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**: 739–750.
- Deshpande, A.M. and C.S. Newlon. 1992. The *ARS* consensus sequence is required for chromosomal origin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4305–4313.
- Diffley, J.F. and B. Stillman. 1988. Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 2120–2124.
- . 1989a. Similarity between the transcriptional silencer binding proteins ABF1 and RAP1. *Science* **246**: 1034–1038.
- . 1989b. Transcriptional silencing and lamins. *Nature* **342**: 24.
- Dubey, D.D., L.R. David, S.A. Greenfeder, L.Y. Ong, J. Zho, J.R. Broach, C.S. Newlon, and J.A. Huberman. 1991. Evidence suggesting that the *ARS* elements associated with silencers of the yeast mating-type locus *HML* do not function as chromosomal DNA replication origins. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5346–5355.
- Ebralidse, K.K., S.A. Grachev, and A.D. Mirzabekov. 1988. A highly basic histone H4 domain bound to the sharply bent region of nucleosomal DNA. *Nature* **331**: 365–367.
- Egel, R., M. Willer, and O. Nielsen. 1989. Unblocking of meiotic crossing-over between the silent mating-type cassettes of fission yeast, conditioned by the recessive, pleiotropic mutant *rik1*. *Curr. Genet.* **15**: 407–410.
- Eissenberg, J.C. 1989. Position effect variegation in *Drosophila*: Towards a genetics of chromatin assembly. *BioEssays* **11**: 14–17.
- Eissenberg, J.C., T.C. James, H.D.M. Foster, T. Hartnett, V. Ngan, and S.C. Elgin. 1990. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 9923–9927.
- Ekwall, K. and T. Ruusala. 1994. Mutations in *rik1*, *clr2*, *clr3*, and *clr4* genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast. *Genetics* **136**: 53–64.
- Feldman, J.B., J.B. Hicks, and J.R. Broach. 1984. Identification of sites required for repression of a silent mating-type locus in yeast. *J. Mol. Biol.* **178**: 815–834.
- Ferguson, B.M. and W.L. Fangman. 1992. A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* **68**: 333–339.
- Ferguson, B.M., B.J. Brewer, A.E. Reynolds, and W.L. Fangman. 1991. A yeast origin of replication is activated late in S phase. *Cell* **65**: 507–515.
- Fields, S. and O.K. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246.

- Fields, S. and R. Sternglanz. 1994. The two-hybrid system: An assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**: 286-292.
- Foss, M., F.J. McNally, P. Laurenson, and J. Rine. 1993. Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*. *Science* **262**: 1838-1844.
- Francesconi, S.C. and S. Eisenberg. 1989. Purification and characterization of OBF1: A *Saccharomyces cerevisiae* protein that binds to autonomously replicating sequences. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2906-2913.
- . 1991. The multifunctional protein OBF1 is phosphorylated at serine and threonine residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 4089-4093.
- Gilson, E., T. Laroche, and S.M. Gasser. 1993a. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* **3**: 128-134.
- Gilson, E., M. Roberge, R. Giraldo, D. Rhodes, and S.M. Gasser. 1993b. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J. Mol. Biol.* **231**: 293-310.
- Goldman, M.A., G.P. Holmquist, M.C. Gray, L.A. Caston, and A. Nag. 1984. Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science* **224**: 686-692.
- Gottlieb, S. and R.E. Esposito. 1989. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**: 771-776.
- Gottschling, D.E. 1992. Telomere-proximal DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is refractory to methyltransferase activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 4062-4065.
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, and V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of pol II transcription. *Cell* **63**: 751-762.
- Haber, J.E. and J.P. George. 1979. A mutation that permits the expression of normally silent copies of mating type information in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **93**: 13-35.
- Halfter, H., B. Kavety, J. Vandekerckhove, F. Kiefer, and D. Gallwitz. 1989. Sequence, expression and mutational analysis of BAF1, a transcriptional activator and *ARSI*-binding protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **8**: 4265-4272.
- Hardy, C.F.J. 1991. "Studies on RAP1 and the RAP1 interacting factor, RIF1." Ph.D. thesis, Columbia University, New York.
- Hardy, C.F.J., D. Balderes, and D. Shore. 1992a. Dissection of a carboxy-terminal region of the yeast regulatory protein RAP1 with effects on both transcriptional activation and silencing. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1209-1217.
- Hardy, C.F.J., L. Sussel, and D. Shore. 1992b. A RAP1-interacting protein involved in silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* **6**: 801-814.
- Hazelrigg, T., R. Levis, and G.M. Rubin. 1984. Transformation of *white* locus DNA in *Drosophila*: Dosage compensation, *zeste* interaction, and position effects. *Cell* **36**: 469-481.
- Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**: 1395-1402.
- Hecht, A., T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S.M. Gasser, and M. Grunstein. 1995. Histone H3 and H4 N termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: A molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583-592.
- Henikoff, S. 1990. Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* **6**: 422-426.
- . 1994. A reconsideration of the mechanism of position effect. *Genetics* **138**: 1-5.
- Henry, Y.A.L., A. Chambers, J.S.H. Tsang, A.J. Kingsman, and S.M. Kingsman. 1990. Characterization of the DNA binding domain of the yeast RAP1 protein. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2617-2623.
- Ivy, J.M., A.J.S. Klar, and J.B. Hicks. 1986. Cloning and characterization of four *SIR* genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 688-702.
- Johnson, L.M., A.G. Fisher, and M. Grunstein. 1992. Identification of a non-basic domain in the histone H4 N-terminus required for repression of the yeast silent mating loci. *EMBO J.* **11**: 2201-2209.

- Johnson, L.M., P.S. Kayne, E.S. Kahn, and M. Grunstein. 1990. Genetic evidence for an interaction between SIR3 and histone H4 in the repression of the silent mating loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 6286-6290.
- Karpen, G.H. 1994. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 281-291.
- Karpen, G.H. and A.C. Spradling. 1992. Analysis of subtelomeric heterochromatin in the *Drosophila* minichromosome *Dp1187* by single *P* element insertional mutagenesis. *Genetics* **132**: 737-753.
- Kayne, P.S., U.J. Kim, M. Han, J.R. Mullen, F. Yoshizaki, and M. Grunstein. 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* **55**: 27-39.
- Kennedy, B.K., N.R. Austriaco, J. Zhang, and L. Guarente. 1995. Mutation in the silencing gene *SIR4* can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80**: 485-496.
- Kimmerly, W., A. Buchman, R. Kornberg, and J. Rine. 1988. Roles of two DNA-binding factors in replication, segregation and transcriptional repression mediated by a yeast silencer. *EMBO J.* **7**: 2241-2253.
- Klar, A.J.S., S. Fogel, and K. McLeod. 1979. *MAR1*-a regulator of *HMa* and *HMa* loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **93**: 37-50.
- Klar, A.J.S., J. N. Strathern, and J.A. Abraham. 1984. Involvement of double-stranded chromosomal breaks for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**: 77-82.
- Klar, A.J.S., J. N. Strathern, J.R. Broach, and J.B. Hicks. 1981. Regulation of transcription in expressed and unexpressed mating-type cassettes of yeast. *Nature* **289**: 239-244.
- Klar, A.J.S., S.N. Kakar, J.M. Ivy, J.B. Hicks, G.P. Livi, and L.M. Miglio. 1985. *SUM1*, an apparent positive regulator of cryptic mating-type loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **111**: 745-758.
- Klein, F., T. Laroche, M.E. Cardenas, J.F.-X. Hofmann, D. Schweizer, and S.M. Gasser. 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J. Cell. Biol.* **117**: 935-948.
- Kurtz, S. and D. Shore. 1991. The RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast. *Genes Dev.* **5**: 616-628.
- Kyrion, G., K.A. Boakye, and A.J. Lustig. 1992. C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5159-5173.
- Kyrion, G., K. Liu, C. Liu, and A.J. Lustig. 1993. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**: 1146-1159.
- Laman, H., D. Balderes, and D. Shore. 1995. Disturbance of normal cell-cycle progression enhances transcriptional silencing in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3608-3617.
- Laurenson, P. and J. Rine. 1991. *SUM1-1*: A suppressor of silencing defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **129**: 685-696.
- . 1992. Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol. Rev.* **56**: 543-560.
- Lee, S. and D.S. Gross. 1993. Conditional silencing: The *HMRE* mating-type silencer exerts a rapidly reversible position effect on the yeast *HSP82* heat shock gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 727-738.
- Levis, R., T. Hazelrigg, and G.M. Rubin. 1985. Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the *white* gene of *Drosophila*. *Science* **229**: 558-561.
- Li, J.J. and I. Herskowitz. 1993. Isolation of *ORC6*, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* **262**: 1870-1874.
- Lima-de-Faria, A. 1983. *Molecular evolution and organization of the chromosome*. Elsevier, Amsterdam.
- Lin, R., J.W. Leone, R.G. Cook, and C.D. Allis. 1989. Antibodies specific to acetylated histones document the existence of deposition- and transcription-related histone acetylation in *Tetrahymena*. *J. Cell Biol.* **108**: 1577-1588.

- Liu, C., X. Mao, and A.J. Lustig. 1994. Mutational analysis defines a C-terminal tail domain of RAP1 essential for telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**: 1025–1040.
- Livi, G.P., J.B. Hicks, and A.J.S. Klar. 1990. The *sum1-1* mutation affects silent mating-type gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 409–412.
- Locke, J., M.A. Kotarski, and K.D. Tartof. 1988. Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* **120**: 181–198.
- Longtine, M.S., N.M. Wilson, M.E. Petracek, and J. Berman. 1989. A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr. Genet.* **16**: 225–240.
- Loo, S. and J. Rine. 1994. Silencers and domains of generalized repression. *Science* **264**: 1768–1771.
- Lorentz, A., K. Ostermann, O. Fleck, and H. Schmidt. 1994. Switching gene *swi6*, involved in repression of silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene* **143**: 139–143.
- Louis, E.J. and J.E. Haber. 1990. Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 547–559.
- . 1992. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**: 559–574.
- Louis, E.J., E.S. Naumova, A. Lee, N. Gennadi, and J.E. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: Its mosaic nature and influence on recombination dynamics. *Genetics* **136**: 789–802.
- Lustig, A.J. 1992. Hoogsteen G-G base pairing is dispensable for telomere healing in yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3021–3028.
- Lustig, A.J., S. Kurtz, and D. Shore. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* **250**: 549–553.
- Mahoney, D.J. and J.R. Broach. 1989. The *HML* mating-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencers. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4621–4630.
- Mahoney, D.J., R. Marquardt, G.-J. Shei, A.B. Rose, and J.R. Broach. 1991. Mutations in the *HML* E silencer of *Saccharomyces cerevisiae* yield metastable inheritance of transcriptional repression. *Genes Dev.* **5**: 605–615.
- Marahrens, Y. and B. Stillman. 1992. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* **255**: 817–823.
- Marshall, M., D. Mahoney, A. Rose, J.B. Hicks, and J.R. Broach. 1987. Functional domains of *SIR4*, a gene required for position effect regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4441–4452.
- McCarroll, R.M. and W.L. Fangman. 1988. Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell* **54**: 505–513.
- McNally, F.J. and J. Rine. 1991. A synthetic silencer mediates *SIR*-dependent functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5648–5659.
- Megee, P.C., B.A. Morgan, B.A. Mittman, and M.M. Smith. 1990. Genetic analysis of histone H4: Essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* **247**: 841–845.
- Michels, C.A., E. Read, K. Nat, and M.J. Charron. 1992. The telomere-associated *MAL3* locus of *Saccharomyces* is a tandem array of repeated genes. *Yeast* **8**: 655–665.
- Micklem, G., A. Rowley, J. Harwood, K. Nasmyth, and J.F.X. Diffley. 1993. Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* **366**: 87–89.
- Miller, A.M. and K.A. Nasmyth. 1984. Role of DNA replication in the repression of silent mating-type loci in yeast. *Nature* **312**: 247–251.
- Moore, G.D., D.A. Sinclair, and T.A. Grigliatti. 1983. Histone gene multiplicity and position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **105**: 327–344.

- Moore, G.D., J.D. Procunier, D.P. Cross, and T.A. Grigliatti. 1979. Histone gene deficiencies and position-effect variegation in *Drosophila*. *Nature* 282: 312-314.
- Moretti, P., K. Freeman, L. Coodley, and D. Shore. 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* 8: 2257-2269.
- Mullen, J.R., P.S. Kayne, R.P. Moerschell, S. Tsunasawa, M. Gribskov, S.M. Colavito, M. Grunstein, F. Sherman, and R. Sternglanz. 1989. Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *EMBO J.* 8: 2067-2075.
- Muller, H.J. 1930. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 22: 299-334.
- Nasmyth, K.A. 1982. The regulation of yeast mating-type chromosome structure by *SIR*: An action at a distance affecting both transcription and transposition. *Cell* 30: 567-578.
- Nasmyth, K.A., K. Tatchell, B.D. Hall, C. Astell, and M. Smith. 1981. A position effect in the control of transcription at yeast mating-type loci. *Nature* 289: 244-250.
- Newlon, C.S. and J.F. Theis. 1993. The structure and function of yeast *ARS* elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 752-758.
- Nimmo, E.R., G. Cranston, and R.C. Allshire. 1994. Telomere-associated chromosome breakage in fission yeast results in variegated expression of adjacent genes. *EMBO J.* 13: 3801-3811.
- Norton, V.G., B.S. Imai, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1989. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* 57: 449-457.
- Oliver, S.G., Q.J. vander Aart, M.L. Agostoni-Carbone, M. Aigle, L. Alberghina, D. Alexandraki, G. Antoine, R. Anwar, J.P. Ballesta, P. Benit, et al. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357: 38-46.
- Orlando, V. and R. Paro. 1995. Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 174-179.
- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75: 543-555.
- Park, E.-C. and J.W. Szostak. 1990. Point mutations in the yeast histone H4 gene prevent silencing of the silent mating type locus *HML*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4932-4934.
- . 1992. *ARD1* and *NAT1* proteins form a complex that has N-terminal acetyltransferase activity. *EMBO J.* 11: 2087-2093.
- Paro, R. 1993. Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 999-1005.
- Paro, R. and D.S. Hogness. 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 263-267.
- Pillus, L. and J. Rine. 1989. Epigenetic inheritance of transcriptional states in *S. cerevisiae*. *Cell* 59: 637-647.
- Renauld, H., O.M. Aparicio, P.D. Zierath, B.L. Billington, S.K. Chhablani, and D.E. Gottschling. 1993. Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by *SIR3* dosage. *Genes Dev.* 7: 1133-1145.
- Rhode, P.R., K.S. Sweder, K.F. Oegema, and J.L. Campbell. 1989. The gene encoding *ARS*-binding factor I is essential for viability of yeast. *Genes Dev.* 3: 1926-1939.
- Rine, J. and I. Herskowitz. 1987. Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116: 9-22.
- Rine, J., J.N. Strathern, J.B. Hicks, and I. Herskowitz. 1979. A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for and identification of cryptic mating type loci. *Genetics* 93: 877-901.
- Rivier, D.H. and J. Rine. 1992a. An origin of DNA replication and a transcriptional silencer require a common element. *Science* 256: 659-663.

- . 1992b. Silencing: The establishment and inheritance of stable, repressed transcription states. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**: 286–292.
- Rothstein, R. 1991. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 281–301.
- Roy, A., F. Exinger, and R. Losson. 1990. *cis*- and *trans*-acting regulatory elements of the yeast *URA3* promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5257–5270.
- Sandell, L.L., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1994. Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 12061–12065.
- Schnell, R. and J. Rine. 1986. A position effect on the expression of a tRNA gene mediated by the *SIR* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 494–501.
- Schultz, J. 1936. Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **22**: 27–33.
- Shore, D. 1994. RAP1: A protein regulator in yeast. *Trends Genet.* **10**: 408–412.
- Shore, D. and K. Nasmyth. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**: 721–732.
- Shore, D., M. Squire, and K.A. Nasmyth. 1984. Characterization of two genes required for position effect control of mating type. *EMBO J.* **3**: 2817–2823.
- Shore, D., D.J. Stillman, A.H. Brand, and K.A. Nasmyth. 1987. Identification of silencer binding proteins from yeast: Possible roles in *SIR* control and DNA replication. *EMBO J.* **6**: 461–467.
- Singer, M.S. and D.E. Gottschling. 1994. *TLC1*: Template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404–409.
- Singh, J. and A.J.S. Klar. 1992. Active genes in budding yeast display enhanced in vivo accessibility to foreign DNA methylases: A novel in vivo probe for chromatin structure of yeast. *Genes Dev.* **6**: 186–196.
- Singh, P.B., J.R. Miller, J. Pearce, R. Kothary, R.D. Burton, R. Paro, T. C. James, and S. J. Gaunt. 1991. A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.* **19**: 789–794.
- Spradling, A.C. and G.H. Karpen. 1990. Sixty years of mystery. *Genetics* **126**: 779–784.
- Stavenhagen, J.B. and V.A. Zakian. 1994. Internal tracts of telomeric DNA act as silencers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **8**: 1411–1422.
- Stone, E.M., M.J. Swanson, A.M. Romeo, J.B. Hicks, and R. Sternglanz. 1991. The *SIR1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an extragenic suppressor of several mating-defective mutants. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2253–2262.
- Strathern, J.N., A.J.S. Klar, J.B. Hicks, J.A. Abraham, J.M. Ivy, K.A. Nasmyth, and C. McGill. 1982. Homothalic switching of yeast mating-type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT* locus. *Cell* **31**: 183–192.
- Sussel, L. and D. Shore. 1991. Separation of transcriptional activation and silencing functions of the *RAP1*-encoded repressor/activator protein 1: Isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7749–7753.
- Sussel, L., D. Vannier, and D. Shore. 1993. Epigenetic switching of transcriptional states: *cis*- and *trans*-acting factors affecting establishment of silencing at the *HMR* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3919–3928.
- Tartof, K.D., C. Bishop, M. Jones, C.A. Hobbs, and J. Locke. 1989. Towards an understanding of position effect variegation. *Dev. Genet.* **10**: 162–176.
- Terleth, C., C.A. van Sluis, and P. van de Putte. 1989. Differential repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4433–4439.
- Terleth, C., P. Schenk, R. Poot, J. Brouwer, and P. van de Putte. 1990. Differential repair of UV damage in *rad* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: A possible function of G2 arrest upon UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4678–4684.
- Thompson, J.S., A. Hecht, and M. Grunstein. 1993. *Histones and the regulation of heterochromatin in yeast*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 247–256.
- Thompson, J.S., L.M. Johnson, and M. Grunstein. 1994a. Specific repression of the yeast

- silent mating locus *HMR* by an adjacent telomere. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 446-455.
- Thompson, J.S., X. Ling, and M. Grunstein. 1994b. Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **369**: 245-247.
- Thon, G. and A.J.S. Klar. 1992. The *clr1* locus regulates the expression of the cryptic mating-type loci in fission yeast. *Genetics* **131**: 287-296.
- Turner, B.M., A.J. Birley, and J. Lavender. 1992. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**: 375-384.
- van Holde, K.E. 1989. *Chromatin*. Springer-Verlag, New York.
- von Hippel, P.H., S.C. Kowalczykowski, N. Lonberg, J.W. Newport, L.S. Paul, G. D. Stormo, and L. Gold. 1982. Autoregulation of gene expression. Quantitative evaluation of the expression and function of the bacteriophage T4 gene 32 (single-stranded DNA binding) protein system. *J. Mol. Biol.* **162**: 795-818.
- Walmsley, R.M., J.W. Szostak, and T.D. Petes. 1983. Is there left-handed DNA at the ends of yeast chromosomes? *Nature* **302**: 84-86.
- Whiteway, M., R. Freeman, S. Van Arsdell, J.W. Szostak, and J. Thorner. 1987. The yeast *ARD1* gene product is required for repression of cryptic mating-type information at the *HML* locus. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3713-3722.
- Wiley, E.A. and V.A. Zakian. 1995. Extra telomeres, but not internal tracts of telomeric DNA, reduce transcriptional repression at *Saccharomyces* telomeres. *Genetics* **139**: 67-79.
- Wilson, C., H.G. Bellen, and W.J. Gehring. 1990. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**: 679-714.
- Wright, J.H., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* **6**: 197-210.

第七章 发育过程中染色体的程序化愈合

Elizabeth H. Blackburn

Department of Microbiology and Immunology

University of California

San Francisco, California 94143

各种真核生物中,染色体的愈合都是一个程序化过程。1887年,Boveri报道在寄生线虫——马副蛔虫(*Parascaris equorum*)中,早期胚胎的前体细胞中染色体片段化,同时异染色质消失。在其他寄生线虫中也有类似发现:巨头蛔虫(*Ascaris megalocephala*,亦称*Parascaris univalens*)中,在早期胚胎发育的固定阶段,体细胞前体中,二倍体生殖细胞系的单对染色体断裂为40个以上的片段(Muller et al. 1991)。这些片段必须是稳定的,因为它们随后的体细胞分裂过程中被完整地传递。

虽然大多数生物体不经历此类广泛的染色体断裂,但仍有许多生物对偶然性断裂的染色体末端进行相应的发育调控。20世纪30年代,Barbara McClintock证明,在生长的玉米植株中,有一个环状的双着丝粒染色体在两个着丝粒分离时被撕裂,所产生的断裂末端相互融合,形成一个新的环状染色体。重要的是,McClintock最先观察到,断裂末端的这种命运并非不可避免:根据其组织类型和发育阶段,断裂末端可以丧失与其他断裂末端融合的倾向性(McClintock 1939),并推断这样的断裂末端已经“愈合”了。愈合的断裂末端在随后的核分裂过程中和正常端粒一样稳定,暗示在愈合过程中断裂染色体的末端发生了永久性的改变。这种愈合特异性地发生在幼年植物的胚胎第一次合子分裂时或其后不久。但是,在配子体或胚乳组织、或在发育后期的二倍体植物组织中,断裂的染色体末端通常不愈合。尽管程序性染色体片段化不是玉米正常发育过程中的一部分,但这种试验性断裂末端的愈合能力有明显的组织特异性和发育阶段特异性,这暗示有一个受发育调控的特殊的过程可以使断裂的末端愈合。

前几年报道,某些球虫(coccid insect)也对染色体断裂末端的愈合能力进行发育调控。这些物种具有全着丝粒染色体(holocentric chromosome),对这些基因组的归宿已经进行了研究(Blackburn & Szostak 1984)。因为全着丝粒染色体的全长都有明显的着丝粒功能,所以由X射线照射产生的片段具有潜在的分离能力。这样,它们有可能经过多次细胞分裂而维持。但维持这种稳定的状态而不重排可能也需要断裂末端的愈合。这种愈合的能力仍取决于细胞的类型和末端出现的发育时期。回顾玉米的情形,断裂末端能够在胚胎早期和体细胞中愈合,但是在精母细胞中,会发生断裂末端的融合。

玉米和球虫中的研究提示,对偶发的或试验性引起的染色体断裂响应的发育调控可能在真核生物中广泛存在。另一方面,作为发育过程中程序化的一部分,新染色体末端的形成看来又较不普遍,尽管并非仅限于蛔虫。分子研究也揭示特异性片段化染色体上新端

粒的形成在纤毛虫类原虫中受到发育调控(Prescott 1994)。在某些剑水蚤(*Cyclops*)种类的发育过程中,染色体 DNA 消除的细胞学分析表明,端粒的从头形成也可发生于这些甲壳动物中(Blackburn & Szostak 1984)。如下所述,现已证明纤毛虫——四膜虫的端粒从头形成是由端粒酶完成的,与此相关的所有现有证据表明其他生物的发育过程中,程序化端粒形成的情况也如此。本章主要讨论各种真核生物的端粒从头合成的分子特征。

纤毛原虫

目前,纤毛类原虫(ciliated protozoa)最适合于研究发育调控的端粒从头添加的分子过程。这些单细胞真核生物的特征是拥有两个不同的核型:胚的微核和体细胞的巨核(Prescott 1994)。二倍体微核维持代与代之间遗传的一致性,并进行有性接合生殖过程中的减数分裂。微核产生单倍体减数分裂核,此核随后进行两性细胞之间的交配和受精过程。所产生的合子核进行有丝分裂。在旧微核破坏的同时,一个有丝分裂的子核发育为一个新的巨核。在此发育期间,巨核还会通过重复的 DNA 复制循环和转录激活变成多基因组的核,相反,在此过程中微核的转录是沉默的。因此巨核负责基因表达,并且是营养细胞生长和分裂所必需的。在大多数纤毛虫中,微核和巨核都复制其 DNA 并且随每一次营养细胞的分裂而分裂。

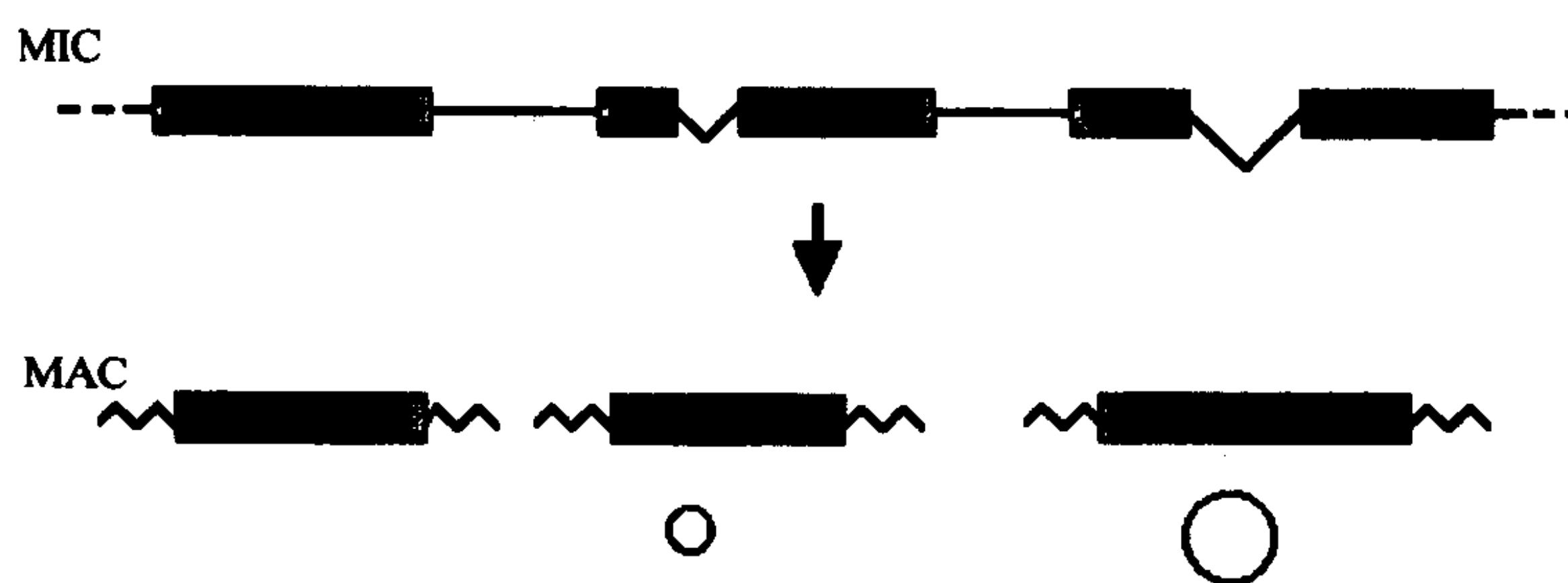


图 7-1 尖毛虫染色体 DNA 在发育过程中的程序化加工

粗黑色条形代表巨核(MAC)决定序列;细线代表微核(MIC)限制性序列,包括在 MAC 发育过程中被去除的内部消除序列(IES);折线代表从头添加的端粒序列。

MAC DNA 末端的阴影区表示不同位点上发生端粒添加的区域。

巨核分化包含一系列基因组的巨大变化。这些基因组变化在巨核发育期间一个界限清楚的阶段反复发生。某些 DNA 序列被消除,位点特异性染色体片段化过程产生特定的线形亚染色体分子(Yao 1989)。由于它们是线形的,所以这些巨核 DNA 在末端需要端粒结构,以完全复制并得以稳定地维持。端粒在巨核发育期间被直接添加到断开的染色体末端(见图 7-1)。如下所述,尽管在许多纤毛虫中,基因组的改变在分子水平上有一些共同的特征,但是在不同种的纤毛虫之间,还是存在着数量和细胞学上的差异(Prescott 1994)。例如在嗜热四膜虫中,5 对微核染色体断裂为 200 个左右、平均长度为 600kb 的线形巨核染色体。在下毛亚目的厚游仆虫,100 个微核染色体断裂为约 2.4×10^4 个 2kb 左右的线形分子(Prescott 1944)。纤毛虫的巨核端粒由串联的、均一 GGGGTT 重复序列构成(在四膜虫及其相近种属中也是如此)。在草履虫中,GGGTTT 重复序列散布在 GGGGTT 重复序列中;在游仆虫及其近亲,包括尖毛虫中散布着 GGGGTTTT 重复序列

(Henderson 本书)。目前研究的微核端粒含有与巨核 DNA 末端相同的、由重复序列组成的长末端片段(Dawson & Herrick 1984; Kirk & Blackburn 1995)。

巨核发育期间发生的其他类型的重排是去除特定的微核序列。有些消除过程使染色体原先分离的区域相连,消除这些区域之间的 DNA 序列段(stretch)[称为内部消除片段(internally eliminated segment, IES)]。在位点特异性发育调控的染色体片段化过程中,通常也有一段微核 DNA 段被去除,但和 IES 去除的情形不同,侧翼序列并不偶联在一起,而是端粒 DNA 从头添加到新断开的 DNA 末端。

DNA 缺失连接和染色体片段化过程是结果完全不同的基因组加工过程。但如下所述,导致这两类重排的这些过程似乎具有相同的分子机制。这种认识是通过研究下毛亚目和全毛亚目纤毛虫的顺式作用信号和选择性加工后认识到的。在纤毛虫和蛔科线虫中也发现了一些共同的特征。

下毛亚目类纤毛虫

许多染色体断裂和端粒从头形成的例子都是通过对下毛亚目纤毛虫的序列分析得到的,这主要得益于它们普遍存在的染色体片段化现象。例如对尖毛虫、厚游仆虫和小范围的棘尾虫都进行了全面的分子研究(Prescott 1994)。通过将合适的厚游仆虫接合型细胞混合在一起,可同时诱发接合和巨核发育(Roth et al. 1985)。和其他下毛亚目纤毛虫一样,厚游仆虫在巨核发育期间,全长的染色体前体首先被复制,然后出现与内部序列有关的多数缺失-连接过程(Roth & Prescott 1985)。然后染色体分裂成大约 10^4 个不同的短的线性 DNA 分子,每一段大约平均长 2kb,且携带一个基因(Baird & Klobutcher 1989)。这些分子在两端都获得端粒 G_4T_4 重复序列。最后,每一个短的线形巨核染色体进行复制,平均每个巨核有 10^3 个拷贝(Baird & Klobutcher 1991)。

染色体断裂和端粒从头添加的顺式作用信号

在下毛亚目中,顺式作用信号标定了巨核发育期间染色体断裂和端粒添加的位点,这些信号是通过将直接添加端粒 DNA 重复序列的 DNA 序列、以及巨核端粒区序列和那些已知的微核 DNA 前体区域的序列进行对比而确定的。在厚游仆虫、新种尖毛虫或伪尖毛虫的微核前体区域中都没有发现预先存在的端粒重复序列(Klobutcher et al. 1984; Baird & Klobutcher 1989; Herrick et al. 1987)。在尖毛虫种属中,比较许多端粒添加区域,并不能分辨出顺式作用信号。相反,在游仆虫中发现了明显的顺式作用序列的保守序列。在大多数小腔游仆虫(*E. aediculatis*)、厚游仆虫和 *E. octacarinatus* 巨核染色体端粒中,第一个端粒 G_4T_4 重复正好位于 TTCAA 序列下游 17bp 处(Klobutcher et al. 1981; Prescott 1994; H. Schmidt 个人通讯)。在厚游仆虫中,此序列组成了该物种中所有巨核端粒的一段较长的共有序列中的高度保守核心序列,下文将详细阐述(Baird & Klobutcher 1989)。因此认为,这种以 TTCAA 为核心的共有序列是染色体断裂和端粒从头添加的顺式作用信号(Baird & Klobutcher 1989)。

端粒添加的备选位点

巨核端粒区域本身序列的确定提供了另一类信息——微核前体序列上端粒添加位点

的重复性或精确性。这是通过对多个独立衍生的特定巨核端粒添加位点进行测序得到的。在厚游仆虫中,人们发现,对于特定的巨核端粒,第一个端粒序列残基添加到任何特定的端粒添加位点的位置,对于核苷酸而言,是高度重复的(Baird & Klobutcher 1989)。在伪尖毛虫(*O. fallax*)中,已发现特定端粒上的端粒添加位点在 33 个核苷酸内变动(Herrick et al. 1987)。新种尖毛虫中也存在类似的微观不均一性。

在伪尖毛虫中的某些巨核染色体上,端粒形成位点表现出不同的、大范围的变化(Cartinhour & Herrick 1984)。例如,一个特殊的染色体组,即第 81 家族,形成带有共同区段的三个一组重叠的线形分子。所有这三个重叠的线形分子都存在于一个单独的巨核上,这是由微核前体染色体相同区域的不同加工造成的(Cartinhour & Herrick 1984)。

端粒从头添加的酶学特征

如下文所述,已在嗜热四膜虫中证实,端粒酶将所有的端粒重复核苷酸序列添加到巨核 DNA 分子上。所有可得到的证据表明,在下毛亚目中也是如此。因此可以推测,在巨核发育过程中,高度调控的端粒从头添加过程伴随着相应的端粒酶组分的调控。这已在厚游仆虫的端粒酶 RNA 水平观察到了(Price et al. 1994)。在巨核发育期间,就在端粒添加发生之前,细胞中端粒酶 RNA 水平稳定缓慢上升,以致于在端粒添加期间(接合开始后约 55~60h),端粒酶 RNA 的稳定水平最高可达活跃增殖细胞的 RNA 稳定水平的 12~13 倍。巨核发育期间端粒酶 RNA 的缓慢上升反映了限速的转录或端粒酶 RNP 装配。为了产生发育期间所需的足够多的酶,端粒酶 RNP 必须事先开始聚集,以便能够同时在每个细胞中进行数百万个新端粒的从头合成(Price et al. 1994)。

除了通常的富含 AT 的特点外,添加第一个端粒重复序列的核苷酸并无明显的特殊性。这有些令人感到意外,因为端粒酶利用一个短序列作为端粒重复序列合成的模板,这个短序列位于该酶的 RNA 部分,并与端粒重复序列互补(Greider & Blackburn 1989; Yu et al. 1990; Greider 本书)。在体外,端粒 DNA 的 3' 末端与模板区域的一部分形成碱基配对,并沿端粒酶 RNA 模板引发模板延伸。因此,延伸期间所添加的下一个核苷酸取决于与作为端粒添加引物的 DNA 3' 末端最近的核苷酸序列(Greider 本书)。但在巨核发育期间,从头添加了第一个重复序列的序列,并未显示出这种依赖迹象。例如,微核前体中的 A 残基具有一个直接添加的 G₄。而在体外,端粒酶在 3' 端带有 TT 序列的引物上添加了 G₄ 序列。在下毛亚目中,第一个添加的重复序列总是含有全长的 G₄,而 G₃、G₂ 和单个 G 残基从未出现在端粒重复序列的边缘,除非在微核前体序列中已经存在,这和以前知道的端粒酶的体外功能不符。但最近对新种尖毛虫端粒酶(用与 3' 末端的端粒重复序列有少许或没有同源性的引物引发)的体外作用进行的分析揭示了一个可能的类似作用模式。在这些试验中,无论引物的 3' 末端序列是什么,所添加的都是同样的 G₄T₄ 初始重复序列。因此,端粒的添加对引物 3' 末端和 RNA 模板间的杂交并没有明显的依赖性(Melek et al. 1994)。在这种没有引物和模板配对的情况下,第一个重复序列添加模式明显不同于端粒酶对已有的端粒重复序列的延伸。

新生成端粒的长度和序列差异

在厚游仆虫的成熟巨核中,大多数的端粒 DNA 都被维持在一个很短的、均一全长的

状态,包括内部 28bp 的双螺旋($G_4T_4 \cdot C_4A_4$)重复序列和富含 G 的链的 14 个核苷酸末端突起,这样就形成一个固定长度的 3'端悬突(Henderson 本书)。对比之下,新生成的端粒在添加到新断裂的 DNA 分子(将要形成巨核染色体)上后,最初比成熟巨核染色体中的端粒长,而且在全长及富含 G 链的悬突长度上都是不均一的(Roth & Prescott 1985; Vermeesch & Price 1994)。巨核发育期间,大多数从头形成的端粒都是过长的 84bp 双链体,带有不均一的、9~14 个核苷酸的 G_4T_4 链 3'末端悬突。 G_4T_4 重复序列链的 3'末端的残基不同,可以是 G_2 、 G_1 、 T_3 、 T_4 或 T_2 开头,但 T_2 最常见。对比之下,在新添加的(Vermeesch & Price 1994)和成熟的(Klobutcher et al. 1981; Baird & Klobutcher 1989)端粒中,互补的 C_4A_4 重复序列链末端是严格确定的,是一个 5'末端 C_4 。厚游仆虫的接合和巨核形成过程可在实验室的群体培养过程中相对同步地诱发,通过这种方式以及这种纤毛虫端粒较短的特性,可以对新合成的端粒结构进行直接分析(Roth et al. 1985)。

厚游仆虫巨核发育期间,在新形成的超长端粒 DNA 中,也检测到了一组较短的端粒:其 G_4T_4 链仅由 4 个全长的重复序列构成,加上其末端的邻近 G_4T_4 重复序列的一个到几个核苷酸(Vermeesch & Price 1994)。对这些短端粒的 C_4A_4 链的组成还不清楚,很可能它们是还未合成 C_4A_4 互补链的最早添加的端粒产物。

对厚游仆虫中新形成的端粒 DNA 的结构分析,使我们对纤毛虫的端粒从头添加过程有所了解。如下所述,四膜虫的 G 富含链是由端粒酶添加的,而且在下毛亚目很可能也是如此。这意味着端粒酶被吸引到新断裂 DNA 的 3'末端。多数新端粒上所添加的端粒重复序列长度变化很小(10~12 个重复),这是端粒酶对添加过程的调控,还是端粒酶最初添加的更长的 G_4T_4 重复序列片段的快速修剪,这些都不得而知。C 富含链可能是由引发酶-聚合酶以 G_4T_4 重复片段链作模板进行复制的结果。引发酶在 G 富含链中的定位,以及引发酶所催化的从 RNA 到 DNA G_4T_4 重复序列的转换位点,可能取决于结合蛋白间的特异性相互作用、引发酶的序列特异性或者是两种因素综合作用的结果。在厚游仆虫中,有可能介导此功能的蛋白质是一个 51kDa 的厚游仆虫端粒结合蛋白质,它可与单链 G_4T_4 DNA 重复序列特异性地结合。最后,一个新合成的端粒的亚类含有 4 个(未见更少的) G_4T_4 重复序列,这表明这是一个用来包装成端粒-蛋白复合物的单位长度。

厚游仆虫中的超长端粒持续约 15~20h,然后被修剪成更短的、成熟巨核端粒所特有的均一长度。这一修剪发生于没有 DNA 复制时(Vermeesch et al. 1993),这表明这一过程是由一种剪切核酸酶直接作用引起的,而并不能简单地理解为染色体末端 DNA 没有完成复制(Blackburn 1991)。而且,与端粒酶 RNA 不同(讨论见上文),厚游仆虫的 51kDa 端粒蛋白质的 mRNA 水平在端粒从头添加过程完成后才增高。因此,新形成的超长端粒可能不是由 51kDa 端粒蛋白质直接包装的,相反,该蛋白可能与严格控制的成熟长度的端粒大小有关。

全鞭毛纤毛虫

全鞭毛纤毛虫中,研究得最清楚、最经得起实验检测的是嗜热四膜虫和某些草履虫种属,对少数其他物种也有了一些了解。嗜热四膜虫基因组在巨核发育期间分解为数百个线形巨核染色体。虽然微核染色体中有相当数量的内部 G_4T_2 重复序列片段(Karrer 1986),而且微核端粒含有末端 G_4T_2 重复序列(Kirk & Blackburn 1995),但有几点证据表明,所

有的这些 G_4T_2 片段在巨核发育期间都被消除,并且不被用做新巨核端粒的来源(Karrer 1986)。相反,新的端粒 DNA 是从头添加的。

端粒从头添加的酶学

嗜热四膜虫中端粒酶 RNA 的稳定水平在巨核发育期间上升了几倍(Avilion et al. 1992)。正如下毛亚目那样,无论前面是什么核苷酸,嗜热四膜虫在非端粒末端(在基因组重组中断裂)添加的第一个端粒重复序列几乎总是含有一个全长的 G_4 片段(Challoner & Blackburn 1986; Yao et al. 1987; Yu & Blackburn 1991)。因此,确定这些最初序列是否是由端粒酶加上的十分有意义,这可借助突变的四膜虫端粒酶 RNA 监测四膜虫体内端粒酶的作用来实现(Yu & Blackburn 1991)。每一突变体端粒酶 RNA 基因都含有一个已被改变的模板序列,该序列引起相应的突变端粒重复序列的合成。突变重复序列被直接连接在非端粒序列中的染色体断裂位点(Yu & Blackburn 1991)。因此,端粒酶负责将第一个端粒重复序列从头添加到非端粒末端(在发育调控的染色体片段化过程中产生),从而使这些末端愈合。

这些实验还表明,端粒的从头合成使用由亲代的巨核编码的突变体“母体”端粒酶 RNA。因此,含有亲代编码 RNA 的端粒酶必须进入新巨核,并在那里发挥作用。但这种亲代端粒酶在新巨核形成后并未持续很多代,因为新端粒被加上了野生型重复序列(具有野生型新巨核特性)的“帽子”(Yu & Blackburn 1991)。

这些结果也首次提出,在其他真核生物中,端粒酶也可以通过把端粒序列直接添加到非端粒断裂末端来愈合断裂的染色体(Cooke 本书)。如果在所有情况下端粒酶对断裂末端的愈合都可以有效地进行,那么断裂的染色体末端就不会有明显的体内常见的不良后果。这种不良效应表明,在发育过程的许多阶段,端粒酶介导的愈合作用的发生频率可能非常低。在后生动物中,端粒酶愈合断裂末端的能力在发育的某些特殊阶段可能是高效的(McClintock 1941),因为只有在这些阶段才有端粒酶的存在(Greider 本书; Harley 本书; de Lange 本书)。

四膜虫端粒从头形成期间端粒酶缺乏持续合成能力

在四膜虫中端粒的从头形成过程包括快速添加大约 0.3~0.4kb 的端粒 G_4T_2 重复片段,未发现更短的中间体(Larson et al. 1987)。尽管端粒酶可以在体外持续发生作用(Greider 本书),但在体内很多情况下都是非持续性的(Collins & Greider 1993; Lee & Blackburn 1993; Lee et al. 1993)。在发育调控下,端粒添加的快速性提示端粒酶可能在体内从头合成端粒的过程中持续发挥作用。但是,当对新合成的端粒(带有两种不同的端粒重复序列单位)进行序列分析后,否定了这种可能性的存在。在上述的突变端粒酶 RNA 基因实验中,一个四膜虫的端粒酶 RNA 基因(其所带有的突变了模板具有突变的 G_5T_2 或突变的 G_4TC 重复序列的特性)在四膜虫细胞中和野生型基因(该基因限定 G_4T_2 重复序列的合成)一同表达。这些细胞克隆的端粒是由高度散布的突变体 G_5T_2 (或 G_4TC)序列与野生型 G_4T_2 重复序列混合组成的(Yu & Blackburn 1991)。先前的结果表明,这两个重复序列由不同的端粒酶核糖核蛋白分子(携带的 RNA 有不同的模板序列)合成而来(Yu et al. 1990)。因此,不同重复序列单位的散在分布提供了端粒酶在体内连续合成的

信息。相同序列的串联重复序列的数目最常见的是 1~4 个,表明端粒酶在体内以一种最散布的方式发生作用(Yu & Blackburn 1991)。因此,即使端粒酶在达到最大合成速率的条件下发挥作用(即从头添加端粒),但在体内,端粒酶与引物结合后也平均仅合成一个端粒重复序列,而后即解离,以便让另一个带有不同 RNA 模板的端粒酶分子添加下一个端粒重复序列。四膜虫体内的端粒与端粒结合蛋白形成复合物(Chiou & Blackburn 1981; Budarf & Blackburn 1986; P. Cohen & E. H. Blackburn 待发表),这些蛋白可能在每一轮模板复制后有效地与端粒酶竞争新合成的端粒末端。有人提出端粒酶所合成的延伸的 G 富含链通过体内后随链的合成而复制(Shampay et al. 1984)。聚合酶-引发酶也因此竞争该 G 富含链,并减少端粒酶的延伸反应。

四膜虫中取得的这些结果使我们可以进一步了解其他种类生物中端粒 DNA 的合成模式。在一些种类中,端粒重复序列单位是 2 种等长重复序列的混合体,但是在重复序列的特定位置上有两个不同的核苷酸(Henderson 本书)。在草履虫(G_4T_2 和 G_3T_3 重复序列)和疟原虫(*Plasmodium*)(AG_3T_3 和 AG_3T_2C 重复序列)中,不同重复序列的分布似乎是随机的,而且在已公布的有关这些生物的端粒序列中,不同重复类型的分布直方图在数量上与四膜虫细胞(通过突变的端粒酶 RNA 基因转化形成)中得到的直方图非常相似(Yu & Blackburn 1991)。四膜虫中得到的结果表明,草履虫和变形虫中也有两种端粒酶 RNA,在模板序列的某个位点带有两种不同核苷酸。特别是在疟原虫中,在该位点,一个端粒酶 RNA 带有 rG,另一个则带有 rA,导致 dC 或 dT 被掺入 AG_3T_2C 或 AG_3T_3 两种类型的重复序列中。草履虫端粒酶 RNA 在模板位置有 rC 或 rA 存在,导致 G_4T_4 和 G_3T_3 重复序列中存在两个交替出现的 dG 或 dT。

染色体断裂的顺式作用信号

嗜热四膜虫染色体断裂和端粒从头添加都是在一个 15bp 的非常保守的序列指导下完成的,该序列为 AAAGAGGTTGGTTTA,称为染色体断裂序列(chromosome breakage sequence, Cbs)。在对形成核糖体 DNA 微型染色体(rDNA)的微核 DNA(King & Yao 1982)和嗜热四膜虫基因组中的几个端粒形成区域(Yao et al. 1987)进行序列分析时,首次得到了 Cbs。与厚游仆虫端粒添加区域的一个包含 TTCAA 核心的共有序列一样,Cbs 的两侧也是由富含 AT 序列构成。然而,所不同的是,含有 TTCAA 核心的共有序列通常位于巨核内所保留的 DNA 中,而 Cbs 序列则总是位于从巨核中去除的 DNA 中,即位于将要成为巨核染色体的区域之间(见图 7-2)。在所研究的 9 个自然发生的片段化位点中(Challoner & Blackburn 1986; Yao et al. 1987; Yu & Blackburn 1991),Cbs 位于端粒重复序列添加位点约 20bp 处。在嗜热四膜虫和其他四膜虫种类中(Challoner & Blackburn 1986),通过对保留的巨核 DNA(从头添加了端粒 G_4T_2 重复序列)进行的序列比较,可以看出,除了常见的富含 AT 现象外(不限于端粒区域),没有发现保守序列或推测的二级结构。这样,染色体断裂/端粒添加的顺式作用信息似乎位于微核特异性侧翼序列中,可能仅由 Cbs 构成。基因组中存在的 Cbs 的估计总数,以及它们在微核 DNA 中与即将添加巨核端粒的序列的紧密靠近程度,都与嗜热四膜虫中 Cbs 参与所有位点特异性染色体片段化的可能一致。

巨核发育期间端粒从头形成过程必须有足够的 15bp 的 Cbs,其直接证据来源于

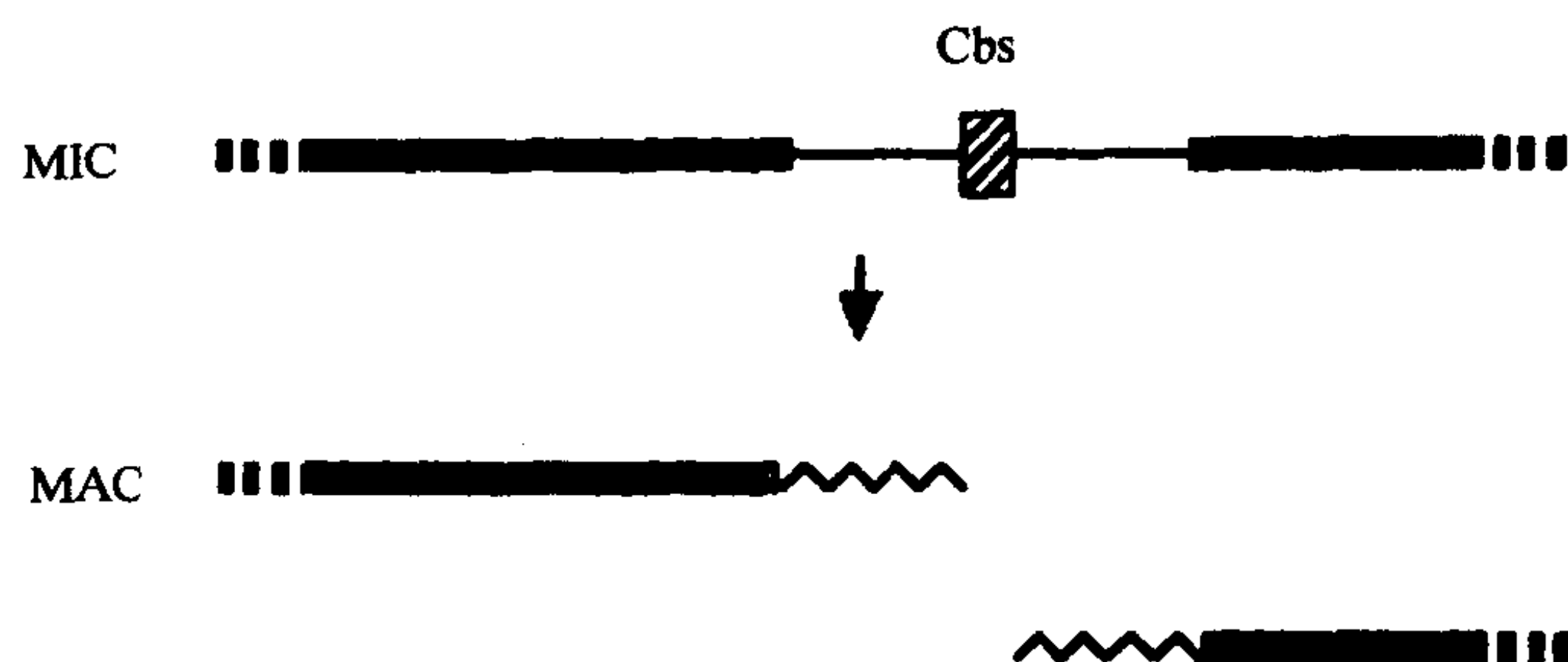


图 7-2 嗜热四膜虫染色体 DNA 的发育调控过程
斜线框表示染色体断裂序列(Cbs)。

DNA 转化实验(Yao et al. 1990)。当单个 Cbs 被插入到一个环形 rDNA 构件(用微注射方法注入正在发育的巨核中)的多位点接头中时,染色体在紧靠插入 Cbs 的部位发生断裂,两个断裂末端都通过端粒的从头添加而愈合,产生一个线形的 rDNA 微型染色体。至于其他基因组位置上天然存在的 Cbs 位点,其端粒添加的准确位置有一些变化。而在这些实验中,端粒添加位点在插入 Cbs 位点两侧的 16bp 的小范围内变动。这是通过检查在所形成的线形、稳定的 rDNA 中,多接头(已嵌入了人工 Cbs)上剩余的限制酶酶切位点的有无来监测的(Yao et al. 1990)。与此类似,对 *T. pigmentosa* 的 2 个亚群中的端粒添加位点进行分析,比较两个亚群中特定的端粒,发现端粒重复序列添加位点上有一个 14bp 的类似差异(Challoner & Blackburn 1986)。这些结果表明,四膜虫,至少在某些端粒中,与尖毛虫类似的微观不均一性也可能正常发生(见图 7-2)。这种微观不均一性可以用两种模型解释:一是 Cbs 指导的断裂可通过内切核酸酶在直接添加端粒 DNA 的不同位点进行切割而产生;另外,Cbs 指导的断裂可发生在一个或多个固定的位点,但在端粒添加之前由外切核酸酶对断裂末端进行了不同程度的切割。

像下毛亚目一样,嗜热四膜虫在巨核发育过程中所使用的大多数端粒从头添加位点都缺乏预先存在的端粒重复序列。目前惟一的例外是 rDNA 前体区域的一端。形成这种端粒的微核 DNA 区域含有端粒序列 TTGGGGTT,嵌于一个典型的富含 AT 区域内(King & Yao 1982)。尽管在一株嗜热四膜虫中发现 rDNA 端粒有不同的端粒添加位点(相差 5bp)(King & Yao 1982; Spangler et al. 1988),但新的端粒序列似乎总是被添加在该序列的这个位点上(Shampay et al. 1984; Spangler et al. 1988; Kapler & Blackburn 1994)。这与上述的转化实验形成对照:在前者,当单个的人工 Cbs 被插入一个没有任何预先存在的端粒重复序列的新位点时,端粒添加位点可在小范围内(约 16bp)变动。因此,产生染色体断裂并不需要正常 rDNA 微型染色体前体中的 TTGGGGTT 序列,该序列可能只是作为端粒酶延伸的适宜引物使端粒酶定位在该序列上(Lee & Blackburn 1993)。对几个独立形成的 rDNA 端粒进行序列分析,可能发现微核 TTGGGGTT 序列未被去除的迹象。如上所述,这些 rDNA 端粒在突变的端粒酶 RNA 基因存在时被从头合成。7 个测序样本中有 4 个含有突变重复序列,紧邻预先存在的 TTGGGGTT 序列(Yu & Blackburn 1991)。

在一个转化实验中,发现 Cbs 序列与端粒添加过程本身以及染色体断裂之间存在着功能性联系。用限制酶在含有 Cbs 的多接头处切断转化的环形 rDNA 构件,去除其中的

Cbs,使之呈线状。在这种情况下,限制性切割断裂末端上不发生端粒的从头合成(Yao et al. 1990)。这个结果与 Cbs 参与将端粒酶吸引到 DNA 新断裂末端过程的事实一致。

Cbs 与其他巨核基因组变化之间进一步的功能联系是通过遗传学实验发现的。这些实验所涉及的 rDNA 突变体在发育调控的切割和扩增等各方面均受到影响(Kapler & Blackburn 1994)。在两个独立的突变体, *rmm6* 和 *rmm11* 中,位于 3' 端端粒形成区域中 Cbs 的同点突变只使 75% 的突变体细胞在该位置发生的有效片段化/端粒添加过程轻度减少。其他 25% 的突变体细胞中,确实发生了正确的端粒添加,并且精确到核苷酸水平。但令人不解的是,这种轻度的片段化缺陷却使 rDNA 扩增急剧减少:在 *rmm6* 或 *rmm11* 细胞中,能够将 rDNA 扩增到一定程度,足以维持随后的细胞活性的细胞数目减少了 5 个数量级。因此,染色体片段化、侧翼 DNA 的去除、端粒的从头添加和随后的巨核 DNA 染色体的正确扩增在巨核发育过程中可能都有功能性联系,并且互相调节。

嗜热四膜虫中紧靠端粒添加位点,有保守性很强的 Cbs 存在,同时端粒从头添加位点相对准确,这些与草履虫中的观察结果形成鲜明对比。如上所述,草履虫的端粒重复序列由一个紧密嵌合的 G_4T_2 和 G_3T_3 六聚体重复序列混合物组成(Henderson 本书)。在 *P. Tetraurelia* 和 *P. Primaurelia* 中,已经对某些表面抗原基因附近巨核端粒的从头形成过程进行了遗传学和分子途径的研究。遗传学研究得知,每一种表面抗原基因在微核染色体中都是单拷贝的,但发现携带此基因的巨核染色体有许多不同的版本(Baroin et al. 1987; Forney & Blackburn 1988)。 *P. Tetraurelia* 的端粒在表面抗原 A 基因下游 3 个不同的相距较远的区域形成(Forney & Blackburn 1988)。在最靠近此基因的端粒添加位点上,克隆并测定了几种不同的端粒序列。实际上,端粒添加位点是一条区带,包括数百个碱基对。因此,在不同的巨核 DNA 分子上, G_4T_2 和 G_3T_3 重复序列显然被添加在这条区带的不同位点上(见图 7-3)(Forney & Blackburn 1988)。在 *P. Primaurelia*,位于表面抗原 G 基因附近的端粒也出现相似的情形:几个相隔较远的端粒添加区带,每条区带中的端粒添加位点散布在一条有数百个碱基对的区带上(Baroin et al. 1987)。这种相距较远的、可选择使用的端粒形成位点是上述伪尖毛虫第 81 条巨核 DNA 家族的残留物。伪尖毛虫的情况也一样,通过比较端粒添加位点的侧翼序列,在这些草履虫中仍没有发现端粒添加区带所特有的顺式作用信号。

草履虫中,可供选择的端粒添加区域的一个显著特点是存在被选择性加工的内部消除序列(internal eliminated sequences, IES),这种情况目前仅在这些纤毛虫中发现。在这些区域中,特定的 IES 缺失是否和所选用的端粒添加区带有关。 *P. primaurelia* 的 G-表面抗原基因下游一个特殊的小 IES 的缺失,与使用远端、下游的另一个端粒添加区带有关;此 IES 未缺失时,端粒添加发生于约 0.2kb 范围内(Amar 1994)。在 *P. teraurelia*,可供选择的 3 个端粒添加区带中,离 A 表面抗原基因最近的一个(见图 7-3)含有一个小 IES (190bp),与短的正向重复序列相邻(Forney & Blackburn 1988)。只有在使用这个或另一个远处的端粒添加位点时,这个 IES 才作为 190bp 的短 IES 发生缺失。但是,在使用了 A 基因近端的端粒添加区带的端粒中,出现了更大的缺失,利用的是 190bp IES 的一个边界,但现在却是从一远端位置引进了一个全新区段,并把它连接到 A 基因区域上。这样,端粒添加区域就包含了 A 基因区域和新片段之间的接合部位。通过检查这几个经过选择加工的端粒序列,可以推测出加工过程的顺序:① IES 缺失和连接;② 端粒添加。这与

厚游仆虫中的结果一致。在厚游仆虫,IES 的切除先于端粒添加几个小时发生,几乎和巨核发育同步(Tausta & Klobutcher 1990)。

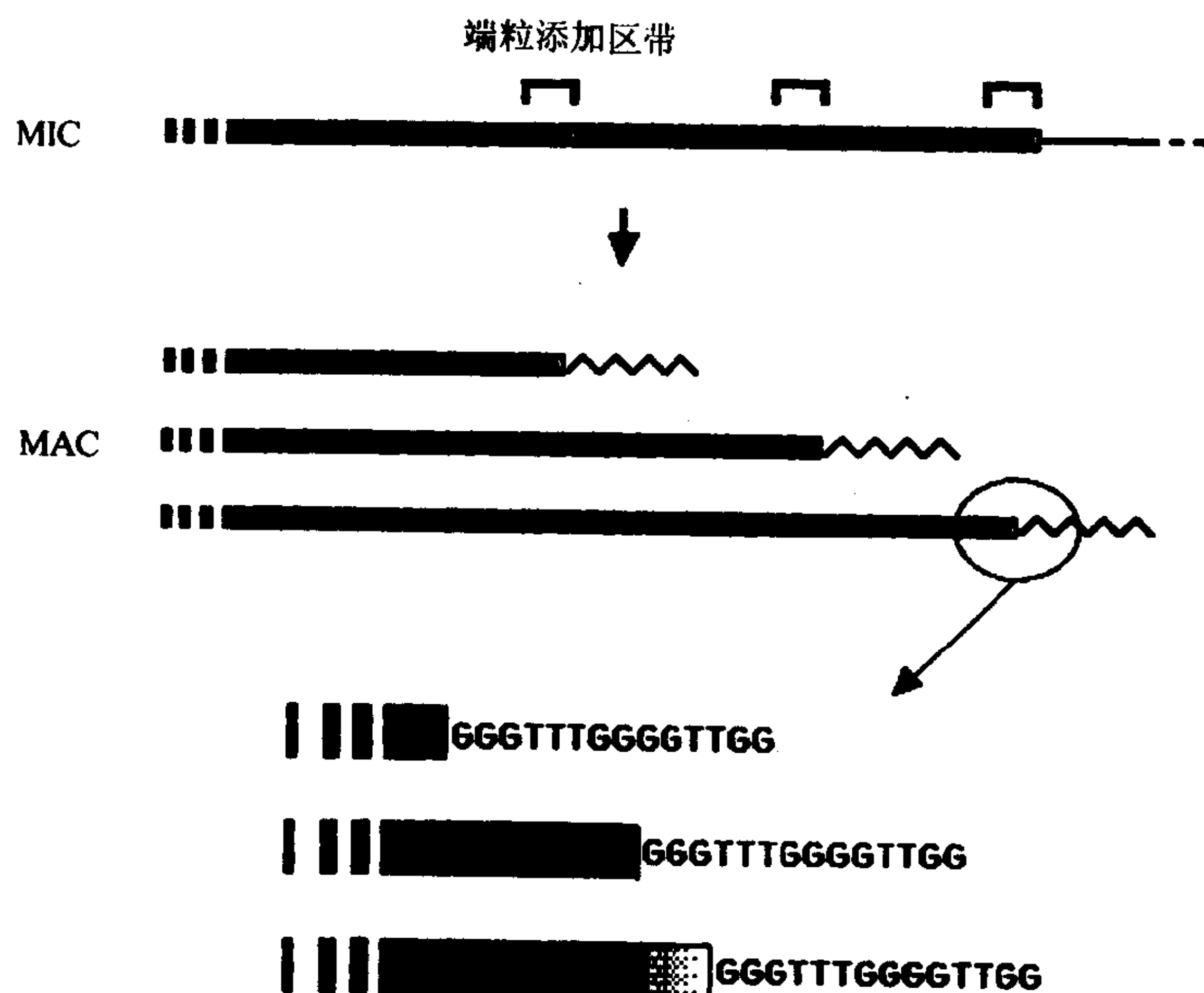


图 7-3 草履虫发育调控的 DNA 加工过程
阴影区为可供选择使用的不同的端粒添加区带, G_3T_3 和 G_4T_2 重复序列(即此种生物中端粒 DNA 重复序列)连接在单个端粒添加区带的不同位点上;其他符号同图 7-1。

蛔科线虫

如上所述,受到发育调控的基因组重构现象最初是通过对马副蛔虫(*parascaris equorum*)和其他寄生线虫的细胞学观察得到的。只是近来才在分子水平对人蛔虫(*A. lumbricoides*)的基因组重构进行了研究(Muller et al. 1991)。在这种线虫中,早期胚胎的第 3 和第 5 次细胞分裂之间,约有 25% 的种系 DNA 被从体细胞中去除。此消除过程包括染色体的末端异染色质区域的丢失,以及在细胞变短的染色体末端发生的端粒从头添加。对这一特异的种系染色体区域(该区域将以此种方式形成一个新的体细胞染色体端粒)进行分析,发现与一些纤毛虫的类似的情形。在人蛔虫中,鉴定出了一个前体染色体的特异区域称为染色体断裂区域(chromosome breakage region, CBR),此区域内的几个位置可以发生端粒重复序列 T_2AG_2C 的从头添加。这种被鉴定和研究的特异的 CBR 延伸约 3~4kb。在该物种的几个不同个体中,端粒添加的位点彼此不同,遍布在整个 CBR 范围内(见图 7-4)。没有可辨别的顺式作用 DNA 信号用以鉴别 CBR 或端粒重复序列添加位点。这种情形(染色体断裂区域的存在和缺乏明显的顺式作用信号)使人联想起两株草履虫(我们已对其染色体重组进行了研究)。伪尖毛虫和新种尖毛虫也缺乏明显的染色体断裂/端粒添加顺式作用信号,但在这些尖毛虫中,特定端粒的位置仅在一个短区域(<50bp)内变化。

在对人蛔虫的端粒从头添加位点进行分析时,还发现了其他一些有趣的特点(Muller

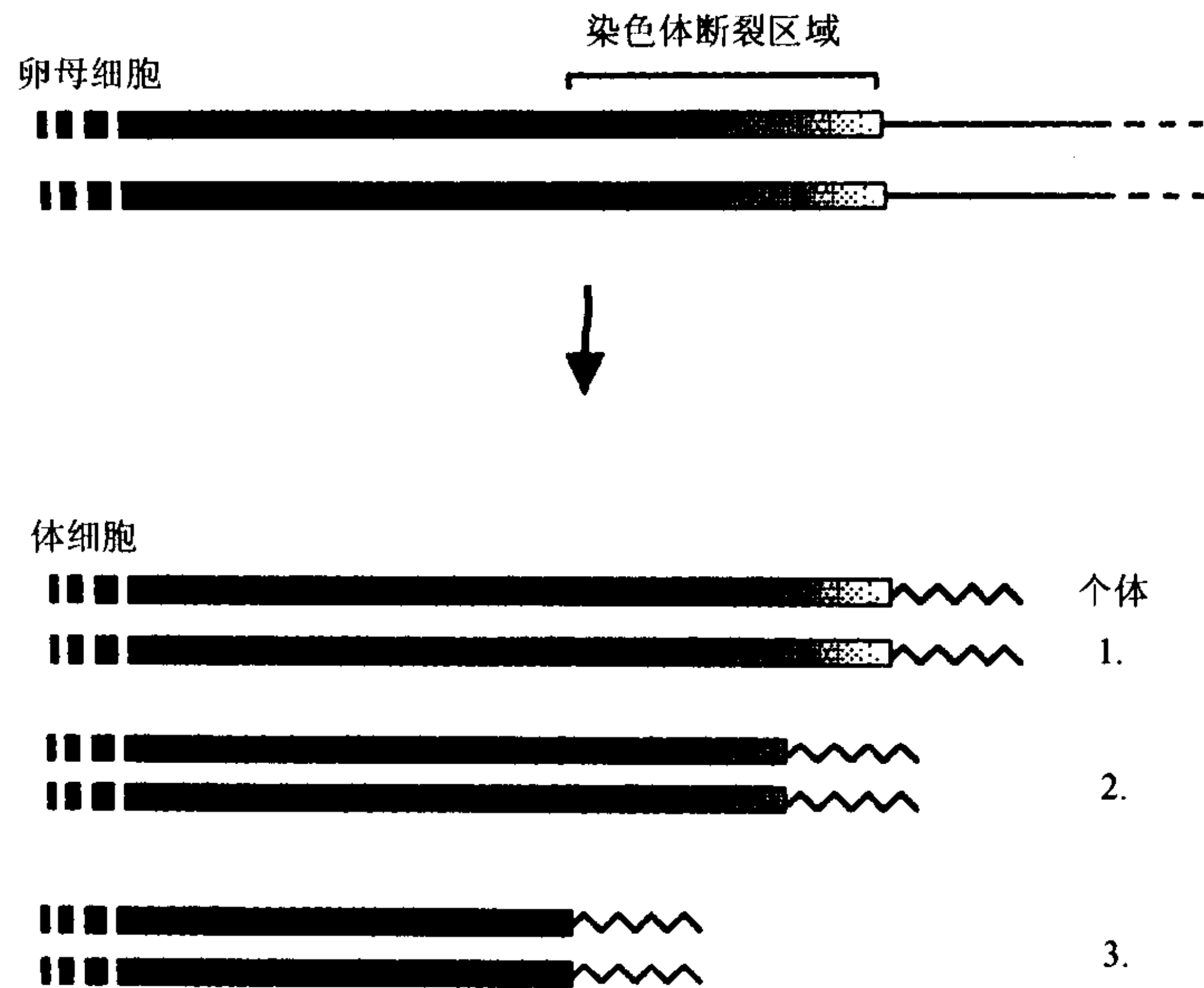


图 7-4 人蛔虫中发育调控的染色体 DNA 程序性加工过程
粗线代表体细胞中存留的 DNA;细直线代表仅见于种系细胞的已被消除的 DNA。该图描述了 3 个生物个体中卵母细胞(生殖细胞系)和体细胞(小肠细胞)的同源染色体配对。阴影区为染色体断裂区域(3~4kb),折线代表在染色体断裂处从头添加的端粒序列,其位置在不同个体中有所不同。

et al. 1991)。如上所述,不同个体 CBR 内的端粒添加位点有所差异。此二倍体生物中,体细胞应该含有通常的二条同源染色体,因此应该已经具有了两种生殖细胞前体染色体,端粒从头添加即发生于其上。但在已检测的体细胞组织(小肠)中,很明显,任何一个个体只使用一个端粒添加位点(见图 7-4)。这一结果提示两条同源染色体上的端粒添加过程可能是协调的。Muller 等人(1991)提出了一个模型,认为在这两个配对的同源染色体端粒添加位置的协调,涉及发育过程中体细胞中同源染色体的配对。两条同源染色体上端粒从头添加的核苷酸位置空间上非常接近,对应的部位核苷酸也相同,而新端粒添加位点的分辨水平较低,不能对两个位置加以区别。因此,也可能在有丝分裂时通过同源染色体对中的端粒交换,一条同源染色体的端粒区域被另一条染色体有效地基因转换。这应该在发育过程早期发生,从而使正在形成成熟躯体组织的二倍体细胞子代中,单一形式占优势。

端粒从头添加与其他发育调控的基因组重排间的协调

草履虫中,端粒从头添加和某些 IES (Forney & Blackburn 1988; Amar 1994) 的去除之间的相反关系表明,两个过程具有功能性的联系。在对下毛亚目纤毛虫厚游仆虫所做的研究中,人们发现了一系列有趣的结果,进一步证明这些看起来不相干的基因组加工过程至少涉及到一些共同的分子元件(Baird & Klobutcher 1989; Jaraczewski & Jahn 1993; Klobutcher et al. 1993)。

如上所述,在游仆虫的大部分巨核端粒中,TTCAA 序列位于巨核端粒邻近序列,正

好与第一个端粒重复序列添加位点相距 17bp (Klobutcher et al. 1981; Baird & Klobutcher 1989)。此外,微核区域产生三个不同的端粒末端区。分析表明,端粒添加位点附近也有相同的 TTCAA 序列,但在这三个末端区中,它在微核前体侧翼中与巨核端粒添加位点的距离是 11bp,而不是 17bp。在这两种情况下——不论是位于端粒添加位点上游 17bp,还是下游 11bp,TTCAA 序列都是较长的共有序列中的高度保守核心序列。此共有序列也见于 Tec 转座子家族的两个端点附近,嵌于这些元件中更大的末端反向重复序列之中(Jarazewski & Jahn 1993)。Tec 共有序列的核心中,TTCAA 序列是高度保守的,并且令人惊异的是,它与 Tec 元件两端的距离也恰恰是 17bp。这种极强的序列匹配与间距的一致性表明,在 Tec 切割(引起缺失-连接)和来自微核基因组的中巨核 DNA 切割(导致端粒的从头合成)这两个过程中,一对交错的 DNA 切割位点受到相同因子指导,该因子对 TTCAA 的共有序列是特异的(见图 7-5)。

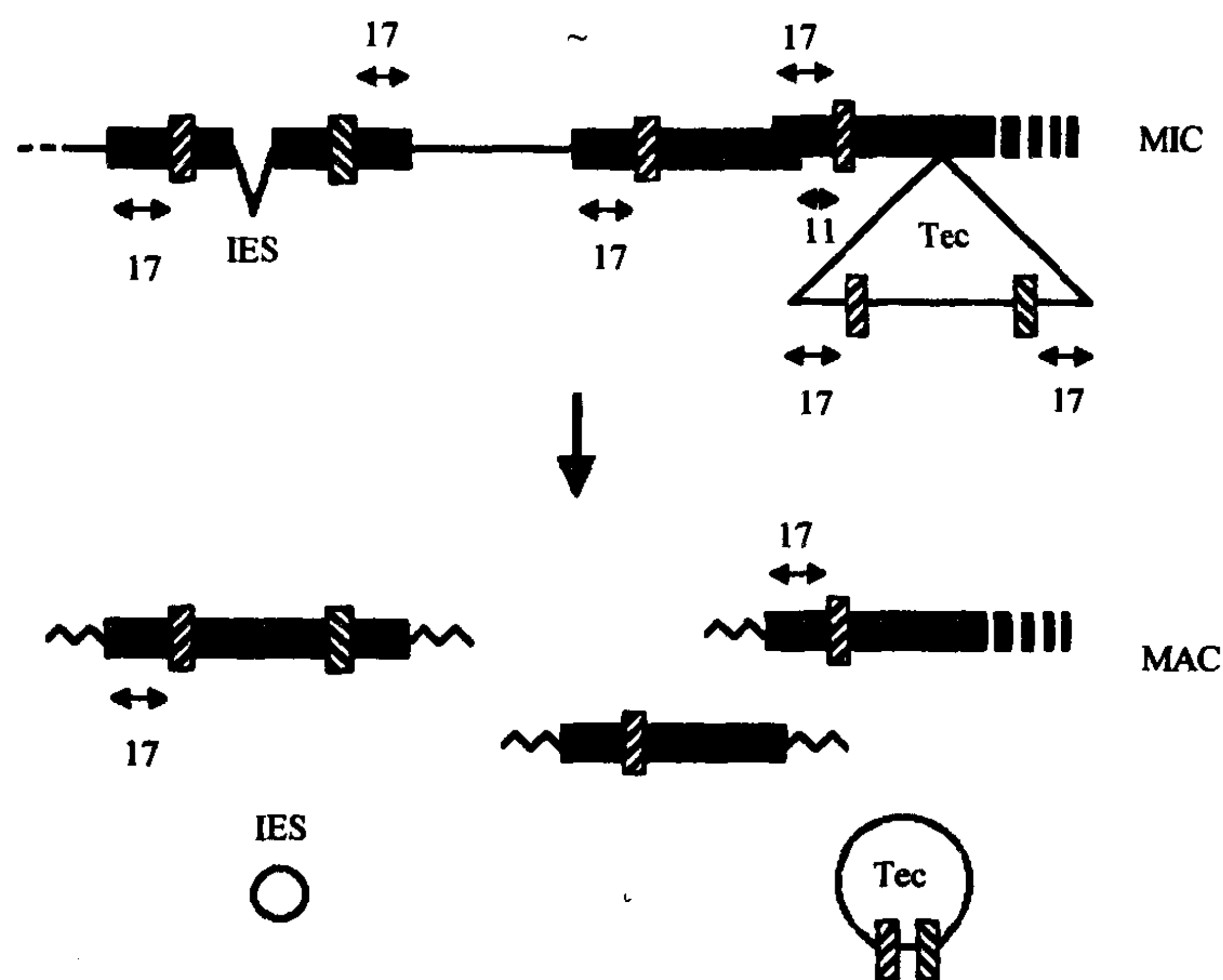


图 7-5 厚游仆虫染色体 DNA 的发育程序化加工过程

粗线代表由 MAC 限定的序列;细线代表 MIC 限定序列,包括 MAC 发育时切除的 IES; MIC 中的三角形和 MAC 中的圆代表 Tec 元件;折线代表从头添加的端粒序列;长方形阴影代表共有序列的 TTCAA 核心序列,位于端粒从头添加位点的 11bp 或 17bp,或在 Tec 元件两端 17bp。

尽管 IES 缺乏 TTCAA 的共有序列,但 Tec 和 IES 两者被切除后,保留的巨核侧翼 DNA 序列可重新连接。在巨核发育期间,在 Tec 切除完成之后,厚游仆虫微核基因组中有几千个 IES 被去除(Tausta & Klobutcher 1990; Klobutcher et al. 1993)。但 IES 和 Tec 元件似乎都是通过同一机制被切割的(Jaraczewski & Jahn 1993; Klobutcher et al. 1993)。IES 有与 Tec 元件的两端相同的末端重复性 TA 序列。两者的切除导致环形切除元件 (IES 或 Tec) 的形成,在环化元件的末端之间有相同长度的杂合双链 DNA,这是在切割过程中,通过交错切割,从侧翼巨核序列中产生的(Jaraczewski & Jahn 1993; Klobutcher et al. 1993)。环化的被切割的 IES 和 Tec 元件最终将被去除。

对伪尖毛虫和嗜热四膜虫的微核染色体中某些端粒重复序列片段的序列组成进行分析,发现转位和端粒从头添加之间存在另一种可能的复杂联系。在伪尖毛虫的微核基因组中有一个称为 TBE1 的元件,它两端各有一段大于 70bp 的反向重复序列,以 17bp 的端粒 G_4T_4 重复序列收尾,其方向有利于端粒的功能 (Herrick et al. 1985)。在检查巨核发育过程中 TBE1 的丢失情况时,还发现 TBE1 是一个转座子。在微核基因组中每一 TBE1 的两侧有一对正向的 AT 双核苷酸重复序列,但精确地切除 TBE1(连同其端粒序列末端)后,巨核基因组中只残留一个 AT (Hunter et al. 1989)。嗜热四膜虫中一个不同类型的染色体内部微核元件——Tel1 元件,其两侧也是反向末端重复序列,末尾是 G_4T_2 重复序列。其方向就好像它是由端粒酶添加的 (Cherry & Blackburn 1985)。Tel1 元件及其侧翼的 G_4T_2 重复片段(通常为简并的 G_4T_2 重复序列)被从巨核基因组中去除,但这明显不是由该元件的精确末端引起的,因为侧翼的微核序列也被切除了 (Cherry & Blackburn 1985)。在纤毛虫进化过程中,端粒重复序列被结合到可移动元件的末端,表明切除过程可能发生错误,并与端粒的从头添加相偶联,导致端粒重复序列的添加,但同时把该元件重新整合到微核基因组的位置。

发育过程中调控的染色体程序化断裂-愈合是如何进化的?

染色体断裂和随之发生的端粒添加对断裂末端的愈合过程是蛔科和纤毛虫体细胞核发育的明显特征。早已注意到,在许多真核生物中,通过端粒添加使偶然断裂染色体愈合的能力也受到发育的调控。这在两种远缘生物,如玉米和球虫,胚胎早期卵子形成后不久,表现得尤为明显。在纤毛虫,巨核发育出现在二倍体合子受精核形成之后不久(相当于多细胞生物中体细胞的发育阶段) (Blackburn & Szostak 1984)。因此,此类发育调控在真核生物可能是保守的。

纤毛虫巨核发育过程中,染色体程序化断裂和再生,受到发育程序化调控,并需要端粒从头添加。这个进化过程可以用下面的假设加以解释。该假设认为,Tec 样元件和 IES 两者都是自在 DNA (selfish DNA),IES 是已经丢失了大多数顺式作用信息的 Tec 样元件的简并形式。在转录不活跃的微核基因组中,Tec 元件似乎已经通过正常的转座而增殖。曾有人假设此增殖过程是可以耐受的,因为巨核发育期间,它们都被有效地从巨核基因组上精确切除了 (Jaraczewski & Jahn 1993)。相同的切除机制,一旦适用于此类发育调控的元件切除,也可用于巨核发育期间 IES 或其他自在 DNA 的切除 (Klobutcher et al. 1993)。因此,只要它们在巨核发育阶段被准确地切除,IES 和 Tec 元件一样,也可以在微核基因组中增殖。游仆虫的巨核发育期间,在 Tec 元件切除之后,IES 被切除,这可能表示由于缺乏含 TTCAA 的共有序列和 Tec 元件的其他特征序列,IES 成为切割机制的不良底物,使它们对此机制的竞争力很小,因此在巨核发育期间它们被有效切除的时间延迟了。

Tec 样元件侧翼的巨核 DNA 两边不能连接,将导致染色体在此处断裂。因此,那些不能和相邻 DNA 连接的位点处发生的 DNA 断裂的必然结果是端粒添加。这种不能连接的一个可能原因是,该元件末端 DNA 切割点的一端或两端的必需顺式作用信号发生突变。但是,在巨核端粒添加位点上,含 TTCAA 的共有序列是高度保守的。这种保守性表明,这些位点上的染色体断裂/端粒添加并不是因为丢失了所有的顺式作用信号。而通过

Tec-IES 切除机制将这些位点切除后, DNA 不能连接的原因可能是巨核发育阶段后期缺乏必需的反式作用连接因子。因为发育中的厚游仆虫, 巨核内染色体断裂和随之发生的端粒添加过程是在 Tec 和 IES 切除后数小时才发生的(见图 7-5)。

这些游仆虫中的观察结果可以扩展成一个更通用的原则, 用于纤毛虫和蛔科线虫。可以提出的一个共同特征就是基因组加工复合物。巨核或早期体细胞发育期间, 该复合物开始在体细胞核的顺式作用 DNA 信号上进行装配。在游仆虫中, 此信号包括含有 TTCAA 核心的共有序列; 而在尖毛虫、草履虫和人蛔虫中, 此信号尚未被确定。其结果依赖于端粒添加因子(包括端粒酶)或 DNA 连接因子对该复合物的竞争。此模型与草履虫中的观察结果一致, 即在某些区域中, IES 切除和端粒添加两者之间似乎没什么相关性。

四膜虫中, 通过这种模型, 顺式作用的 Cbs 信号可能在导致染色体断裂的复合物的起始过程中具有一种类似的作用, 但其结果总是端粒添加。四膜虫体内, 端粒重复序列被直接添加到非端粒序列上, 这个非端粒序列同样值得注意, 因为它们在体外不是纯化的端粒酶的良好引物(Spangler et al. 1988; Lee et al. 1994)。因此, 令人感兴趣的是, 有人提出体内的 Cbs 结合因子就是一种附加因子之一, 它们使端粒酶能利用纯化酶所不能利用的引物序列。四膜虫中 DNA 切割-连接似乎被不同的顺式作用信号所指导(Yao 1989; Wells et al. 1994)。因此, 这种加工过程可能受到包括一系列因子在内的复合物的介导(Yao 1989)。

结语

受到发育调控的端粒形成过程, 其分子生物学方面的诸多问题, 如端粒酶的作用等, 正在逐渐明朗, 但其生物学意义尚未完全弄清楚。还没有一个原理可以根据基因调控、发育策略或任何其他方面的要求, 把不同真核生物中的这种现象联系在一起。但在一些特定的生物体内, 程序化的染色体断裂/愈合过程似乎确实有助于某些功能的完成。在纤毛虫类原虫中, 尤其是在四膜虫中, 体细胞的巨核中有大量的 rRNA 基因拷贝存在, 这是通过特别的切割机制由微核的侧翼序列产生的, 这些序列允许 rDNA 微型染色体独立扩增。但这并不能解释为什么基因组的片段化过程发生于四膜虫基因组中数以百计的其他位点上, 因为除了 rDNA 之外, 四膜虫中所有其他巨核染色体以相似的水平存在。相反, 下毛亚目中, 不同的基因大小的巨核染色体被复制并维持在特征性的基因特异性拷贝数目(Baird & Klobutcher 1991; Prescott 1994)。因此, 以这种方式达到的最佳基因剂量水平可以为染色体片段化以及随之而来的对端粒从头添加的需要提供理论基础。然而, 四膜虫中每一巨核染色体的相对较低的拷贝数(G_1 期巨核约 45 个拷贝)确实提供了一个不同的机会: 通过无丝分裂期间巨核无性分裂过程中基因等位拷贝的随机分配, 体细胞巨核中产生等位基因拷贝的不同组合即“混合重组”(shuffling), 从而在单个巨核的无性分裂后代中快速检验出新等位基因组合。然而, 其他全毛亚目纤毛虫, 如草履虫和下毛亚目纤毛虫中, 巨核染色体过高的拷贝数可以防止这种现象发展到一个显著的水平。在线虫中, 除了体细胞中正常有丝分裂时的染色体分离外, 没有任何迹象出现。因此, 导致发育调控的染色体片段化和端粒从头添加过程的选择压力可能在每一生物中有巨大差异。

致谢

感谢本实验室全体成员提出的宝贵意见和国家卫生署(USA)提供的研究资助。

参考文献

- Amar, L. 1994. Chromosome end formation and internal sequence elimination as alternative genomic rearrangements in the ciliate *Paramecium*. *J. Mol. Biol.* **236**: 421-426.
- Avilion, A.A., L.A. Harrington, and C.W. Greider. 1992. *Tetrahymena* telomerase RNA levels increase during macronuclear development. *Dev. Genet.* **13**: 80-86.
- Baird, S.E. and L.A. Klobutcher. 1989. Characterization of chromosome fragmentation in two protozoans and identification of a candidate fragmentation sequence in *Euplotes crassus*. *Genes Dev.* **3**: 585-597.
- . 1991. Differential DNA amplification and copy number control in the hypotrichous ciliate *Euplotes crassus*. *J. Protozool.* **38**: 136-140.
- Baroin, A., A. Prat, and F. Caron. 1987. Telomeric site position heterogeneity in macronuclear DNA of *Paramecium primaurelia*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 1717-1728.
- Blackburn, E.H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* **350**: 569-573.
- Blackburn, E.H. and J.W. Szostak. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 163-194.
- Boveri, T. 1887. Über differenzierung der Zellkerne während der furchung des eies von *Ascaris megalocephala*. *Anat. Anz.* **2**: 688-693.
- Budarf, M.L. and E.H. Blackburn. 1986. Chromatin structure of the telomeric region and 3'-nontranscribed spacer of *Tetrahymena* ribosomal RNA genes. *J. Biol. Chem.* **261**: 363-369.
- Cartinhour, S.W. and G.A. Herrick. 1984. Three different macronuclear DNAs in *Oxytricha fallax* share a common sequence block. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 931-938.
- Challoner, P.B. and E.H. Blackburn. 1986. Conservation of sequences adjacent to the telomeric C₄A₂ repeats of ciliate macronuclear ribosomal RNA gene molecules. *Nucleic Acids Res.* **14**: 6299-639.
- Cherry, J.M. and E.H. Blackburn. 1985. The internally located telomeric sequences in the germ-line chromosomes of *Tetrahymena* are at the ends of transposon-like elements. *Cell* **43**: 747-758.
- Chiou, S.-S. and E.H. Blackburn. 1981. Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 2263-2267.
- Collins, K. and C.W. Greider. 1993. *Tetrahymena* telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation. *Genes Dev* **7**: 1364-1376.
- Dawson, D. and G. Herrick. 1984. Telomeric properties of C₄A₂ homologous sequences in micronuclear DNA of *Oxytricha fallax*. *Cell* **36**: 171-177.
- Forney, J.D. and E.H. Blackburn. 1988. Developmentally controlled telomere addition in wild-type and mutant *Paramecia*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 251-258.
- Greider, C.W. and E.H. Blackburn. 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**: 331-337.
- Herrick, G., D. Hunter, K. Williams, and K. Kotter. 1987. Alternative processing during development of a macronuclear chromosome family in *Oxytricha fallax*. *Genes Dev.* **1**: 1047-1058.
- Herrick, G., S. Cartinhour, D. Dawson, D. Ang, R. Sheets, A. Lee, and K. Williams. 1985. Mobile elements bounded by C₄A₂ telomeric repeats in *Oxytricha fallax*. *Cell* **43**: 759-768.
- Hunter, D.J., K. Williams, S. Cartinour, and G. Herrick. 1989. Precise excision of telomere-bearing transposons during *Oxytricha fallax* macronuclear development.

Genes Dev. 3: 2101-292.

- Jaraczewski, J.W. and C.L. Jahn. 1993. Elimination of Tec elements involves a novel excision process. *Genes Dev.* 7: 95-105.
- Kapler, G.M. and E.H. Blackburn. 1994. A weak germline excision mutation blocks developmentally-controlled amplification of the rDNA minichromosome of *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.* 8: 84-95.
- Karrer, K.M. 1986. The nuclear DNA of holotrichs. In *The molecular biology of ciliated protozoa* (ed. J.G. Gall), pp. 85-110. Academic Press, Orlando, Florida.
- King, B.O. and M.-C. Yao. 1982. Tandemly repeated hexanucleotide at *Tetrahymena* rDNA free end is generated from a single copy during development. *Cell* 31: 177-182.
- Kirk, K. and E.H. Blackburn. 1995. An unusual sequence arrangement in the telomeres of the germ-line micronucleus in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.* 9: 59-71.
- Klobutcher, L.A., C.L. Jahn, and D.M. Prescott. 1984. Internal sequences are eliminated from genes during macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha nova*. *Cell* 36: 1045-1055.
- Klobutcher, L.A., L.R. Turner, and J. LaPlante. 1993. Circular forms of developmentally excised DNA in *Euplotes crassus* have a heteroduplex junction. *Genes Dev.* 7: 84-94.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3015-3019.
- Larson, D.D., E.A. Spangler, and E.H. Blackburn. 1987. Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena*. *Cell* 50: 477-483.
- Lee, M. and E.H. Blackburn. 1993. Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6586-6599.
- Lee, M.S., R.C. Gallagher, J. Bradley, and E.H. Blackburn. 1993. *In vivo* and *in vitro* studies of telomeres and telomerase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 707-718.
- McClintock, B. 1939. The behavior of successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 25: 405-416.
- . 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282.
- Melek, M., B. Davis, and D.E. Shippen. 1994. Oligonucleotides complementary to the *Oxytricha nova* telomerase RNA delineate the template domain and uncover a novel mode of primer utilization. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7827-7838.
- Muller, F., C. Wicky, A. Spicher, and H. Tobler. 1991. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell* 67: 815-822.
- Prescott, D.M. 1994. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.* 58: 233-267.
- Price, C.M., A.K. Adams, and J.R. Vermeesch. 1994. Accumulation of telomerase RNA and telomere protein transcripts during telomere synthesis in *Euplotes*. *J. Euk. Microb.* 41: 267-275.
- Roth, M. and D.M. Prescott. 1985. DNA intermediates and telomere addition during genome reorganization in *Euplotes crassus*. *Cell* 41: 49-417.
- Roth, M., L. Meiying, and D.M. Prescott. 1985. Large scale synchronous mating and the study of macronuclear development in *Euplotes crassus*. *J. Cell Biol.* 101: 79-84.
- Shampay, J., J.W. Szostak, and E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154-157.
- Spangler, E.A., T. Ryan, and E.H. Blackburn. 1988. Developmentally regulated telomere addition in *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.* 16: 5569-5585.
- Tausta, S.L. and L.A. Klobutcher. 1990. Internal eliminated sequences are removed prior to chromosome fragmentation in *Euplotes crassus* development. *Nucleic Acids Res.* 18: 845-849.
- Vermeesch, J.R. and C.M. Price. 1994. Telomeric DNA sequence and structure following de novo telomere synthesis in *Euplotes crassus*. *Mol. Cell. Biol.* 14: 554-566.

- Vermeesch, J.R., D. Williams, and C.M. Price. 1993. Telomere processing in *Euplotes*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5366–5371.
- Wells, J.M., J.L. Ellington, D.M. Catt, P.J. Berger, and K.M. Karrer. 1994. A small family of elements with long inverted repeats is located near sites of developmentally regulated DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5939–5949.
- Yao, M.-C. 1989. Site-specific chromosome breakage and DNA deletion in ciliates. In *Mobile DNA* (ed. D. Berg and M. Howe), pp. 715–735. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yao, M.-C., K. Zheng, and C.-H. Yao. 1987. A conserved nucleotide sequence at the sites of developmentally regulated chromosomal breakage in *Tetrahymena*. *Cell* **48**: 779–788.
- Yao, M.C., C.H. Yao, and B. Monks. 1990. The controlling sequence for site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena*. *Cell* **63**: 763–772.
- Yu, G.-L. and E.H. Blackburn. 1991. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* **67**: 823–832.
- Yu, G.-L., J.D. Bradley, L.D. Attardi, and E.H. Blackburn. 1990. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* **344**: 126–132.

第八章 非程序化和工程性染色体断裂

Howard Cooke

MRC Human Genetics Unit

Western General Hospital

Edinburgh EH4 2 XU, United Kingdom

作为遗传物质载体的染色体,其完整性对于减数分裂和有丝分裂的基本过程来说都非常重要。我们能够构建基因组的遗传图谱和物理图谱,就是基于这种稳定性。端粒提供了稳定性的重要方面,其功能是在染色体 DNA 分子末端复制及防止染色体末端融合。导入哺乳动物细胞核中的 DNA 并不以独立的分子存在,而是与现有的染色体整合。与此相反,正常情况下染色体本身并不能进行非同源性重组,因为这样会产生双着丝粒或多着丝粒的染色体。当两个活性着丝粒存在于同一条染色体上时,作用在两个着丝粒上的力试图使其在细胞分裂时分离到两个子细胞中,结果导致染色体断裂。如果断裂发生在通常只有一个着丝粒的染色体上,将导致所产生的无着丝粒片段丢失,而且着丝粒部分的末端没有愈合,那么染色体就进入了一系列的断裂-融合-桥循环,这些循环可以通过断端的愈合或者由于细胞死亡(遗传物质丢失的结果)而终止。在酵母中,基因组内出现的单个断裂都会被细胞感受到,并导致细胞分裂的停止。类似的关卡机制很可能也存在于哺乳动物或其他细胞类型之中,*p53* 基因就是一个例子。DNA 的丢失或细胞周期的紊乱后果都是很严重的,在哺乳动物体系中,很少能见到染色体断裂。当这些断裂影响到标记基因的功能时,它们能更频繁地被检出,因此我们对这一过程的了解更偏重于基因组中研究得比较深入的地方,例如人珠蛋白基因和疟原虫细胞表面标记基因。脆性位点,即那些与人类疾病有关的细胞标记物,也促进了人们对可能的断裂位点和机制的研究。

断裂所产生的染色体末端被稳定化,因此人们可以了解断裂的染色体末端的分子性质,它通常获得了端粒重复序列,这证实了“染色体末端稳定复制需要此类 DNA 序列”这一假设。这些重复序列能够经重组而添加(Wang & Zakian 1990)或者通过端粒酶的作用从头加入(Blackburn 1992)。这一观点使末端重复序列被运用到酵母细胞和哺乳动物细胞的染色体片段中,并提出了在兆碱基对水平上进行细胞遗传工程的可能性。

本章首先回顾真核染色体自然发生断裂和端粒愈合断裂的内容,然后介绍活体细胞核内染色体片段上端粒的应用。

哺乳动物基因组中罕见的断裂过程

人类 α -珠蛋白基因座

哺乳动物基因组的大小和复杂程度,以及(到目前为止)现有遗传标记物的相对贫乏

等因素,将哺乳动物细胞染色体断裂分析局限在可见的脆性位点以及含有适当标记基因的基因组范围内。珠蛋白基因座是人类基因组中研究最全面的区域之一。 α -珠蛋白的基因簇位于人类染色体 16q 的远端,在很多 α -地中海贫血的病例中,一些病例编码序列表面看来保持完整,但基因未表达。其中有一例,Wilkie 等(1990)证明在一条染色体上,未表达基因的上游 90kb 的高变区基因座已经缺失。正确表达 β -珠蛋白基因座所必需的 DNA 区域已经被鉴定,而且很有可能在 α -地中海贫血病例中,基因座调控区域已经缺失。进一步研究发现,缺失的位点在距离启动子 5' 端约 50kb 左右的地方,相应的不等长的限制片段对外切核酸酶 BAL 31 的消化敏感,这两方面都说明它是一个 DNA 分子的末端。末端片段的测序表明,脊椎动物端粒末端重复序列(TTAGGG)_n 已经加入到其中。 α -珠蛋白基因座的沉默是染色体末端缺失的结果。此时染色体已经失去了 LCR 区域,而没有失去基因的编码区。很明显,缺失的染色体看起来十分稳定,足以从病人的母亲传递给后代,表明末端同源性缺乏并未阻碍减数分裂配对和配子形成。

添加了端粒重复的序列与带有 GTT 末端的正常末端重复序列相似,它是一个 10~25bp 的内部端粒样序列。在体外利用末端序列和相关序列所进行的实验已经证明,这些序列可以作为四膜虫和人端粒酶的底物(Harrington & Greider 1991;Morin 1991)。这支持了这样的观点:染色体断裂处,通过端粒酶介导在染色体末端添加端粒而愈合,假如必需基因在整个过程中没有丢失,则缺失的染色体仍能保持存活。此外,对另一种 α -地中海贫血病例的分析表明,一个更大的 2Mb 末端缺失发生在 GGGT 序列,与智力迟滞表现型有关。

端粒与 α -珠蛋白基因座的距离在群体中呈现多态性(Wilkie et al. 1991),三个等位基因最大可相差 260kb。断裂后,则会在端粒酶的作用下愈合,此时可产生多态性。有趣的是,这里所涉及到的机制更像在酵母(Zakian & Blanton 1988)和疟原虫(Corcoran et al. 1988)中所观察到的以重组为基础的机制。A 和 C 等位基因间的同源类型很复杂,A 和 C 等位基因拥有共同的亚末端重复序列,B 和 C 等位基因则在较近端序列处相似,最短的 A 等位基因并不是由较长的 B 和 C 染色体经简单截短并添加末端重复序列所产生的,因为 A 等位基因带有其他染色体所没有的亚末端序列。在 A 和 B 等位基因的趋异区域内,有一个不完整的(CA)_n 二核苷酸重复序列。A 中较长($n=300$)、B 中较短($n=15$)。这种单倍型毫无例外都是由亚末端序列和 CA 重复序列构成,说明 A 和 B 等位基因的重组受到了抑制。在(CA)_n 的附近有序列趋异性,相当于 1000 万年的进化差异(Wilkier & Higge 1992)。等位基因 A 和 C 上的亚末端序列可以在很多其他染色体上存在,包括 X、Y 染色体的长臂假常染色体区(Kvaloy et al. 1994)。等位基因 B 亚末端重复序列也存在于其他常染色体之中,大体上,这些序列的存在位置在群体内有所差异(Brown et al. 1990;Cross et al. 1990)。

所有的染色体看起来都有可能受到亚端粒 DNA 内部变化的影响,因此也受到端粒的影响(尽管假常染色体端粒还未观察到这种现象)。如果这可以引起如 16pter 染色体中所见的长度类型的变化,配对或减数分裂就会受到影响。如果染色体配对涉及到重复的同源序列,那么减数分裂期间聚集在核边缘区的端粒就可能成为这一过程启动的最佳位置,原因在于它们彼此之间的距离很近。异常的减数分裂配对也常常会发生,但在染色体 16pter 不同的等位基因的杂合子个体中,尚未检测到减数分裂的特例。如果亚末端序列在

启动配对上确实起到了重要作用,那么还不清楚如何避免由不同染色体上的共有序列引起的复杂情况。

很可能其他染色体也出现类似的断裂过程,这不仅导致末端多态性,也可引起大段缺失,但由于没有易检出表型的报道基因,或是因为必需基因靠近染色体末端,所以断裂表现不明显。这种基因的丢失将会导致单体不全(haplo-insufficiency)和该染色体从群体中丢失。假设人类基因组的端粒区域看起来是基因密集的(Degiorigi et al. 1992; Craig & Bickmore 1994),那后一种可能性也许适用于大部分人类染色体。然而许多曾被认为和多个靠近染色体末端的基因功能丧失有关的综合征,可能是末端缺失所致,这包括 Wolf-Hirschorn 和 Miller-Dieker 综合征。但至今我们仍未发现除 α -珠蛋白以外的染色体断裂和愈合引起的病例的报道。然而,最近的研究表明,亚末端易位常发生在肿瘤细胞中的末端缺失稳定化过程之中(Meltzer et al. 1993)。

脆性位点

从细胞遗传学角度仔细检查人类基因组,人们已发现一系列发生染色体断裂的位点,总数达数百个,有不同的断裂频率。其中一些位点在原代细胞的培养中对培养条件敏感(如叶酸水平等)(Sutherland & Hecht 1985)。一种观点认为端粒酶可以识别内部 TTAGGG 重复序列之间的断裂并使之愈合,从而挽救染色体,这可能表明内部端粒重复序列与脆性位点相一致(Hastie & Allshire 1989)。支持这一假设的主要证据是人 2 号染色体上的共有脆性位点看起来与 TTAGGG 探针杂交的内部位点定位在一起(IJdo et al. 1991a)。这种内部端粒序列位于两个祖先猿染色体发生融合、产生人类第 2 号染色体的地方,这是对很多染色体进行细胞遗传学分带研究得出的结论。有理由推测,这里的序列是原始端粒的残留物(IJdo et al. 1991b)。这一位点出现的亚末端序列也支持了这样的假设。如果脆性位点确实与内部残余端粒相符,那么染色体断裂就相当于酵母中所见的头对头端粒重复序列的分离(Murray et al. 1988)。

还有一些迹象表明,末端重复序列的一些内部位点与脆性位点是等同的,其证据来自原位杂交实验,该实验用四膜虫末端重复序列探针(TTGGGG),原位杂交法检测人类基因组的多个内部位点(Hastie & Allshire 1989),发现一些内部位点与脆性位点重叠。考虑到这两种类型位点的数量、内部 TTGGGG 杂交位点的数量以及原位杂交的分辨精度限制,有些重叠位点应该是随机的。

后期的研究并没有发现端粒序列参与脆性位点形成的迹象。IJdo 等人(1992)详尽地分析了人 2 号染色体的内部端粒序列。通过克隆侧翼 DNA,他们能够将这些序列用作原位杂交探针,检测呈现脆性位点的染色体。结果发现,端粒序列两侧的序列没有被染色体的断裂分离,而且距离脆性位点较远。人类基因组中最有意义的脆性位点,FRAXA,已经被克隆,并发现它与三核苷酸重复序列 CCG_n 有关(Yu et al. 1991)。此基因(包括 CCG_n 重复序列)的一小段缺失,会出现所有重复序列扩展的表现型,但染色体的脆性消失,这说明重复序列就是断裂的位点。还有研究证明另外两个脆性位点(FRAXE 和 FRA16A)与 CCG_n 重复序列有关(Knight et al. 1993; Nancarrow et al. 1994),但到目前为止尚未发现它们与 TTAGGG 重复序列的关系。通过导入重组 DNA,使端粒序列随机整合到组织

培养细胞的基因组,这通常可以产生这些序列的内部位点,这些位点很稳定,产生染色体断裂的机率并不是很高。

疟原虫的非程序化断裂

疟原虫的生活史分为在不同宿主体内的不同组织中数个不同发育阶段。这种生物是寄生虫的典型代表,有 14 条染色体,长度在 0.5Mb 到 3Mb 之间,因此可以采用脉冲电场凝胶电泳的方法进行分析(Corcoran et al. 1988)。通过这一技术对地理远缘隔离种群进行比较,发现染色体长度呈明显的多态性。在无性生活周期中,已经观察到缺失现象,在杂交过程中已产生非亲代长度的染色体。该寄生虫的不同隔离种群中已经反复检测到定位于 2 号染色体的一个基因(*KAHRP*,编码结节相关富含组氨酸蛋白,丢失这种蛋白质后会导致毒力丧失,故而很容易被发现)的缺失(Pologe & Ravetch 1988)。在很多情况下,对缺失基因组的测序表明在基因内断点处存在末端重复序列,说明有断裂和愈合的发生。

至少已证明其他 4 个亚端粒基因 *RESA* (Pologe et al. 1990)、*Pf11-1*、*HRP I* 和 *HRP II* 都可以缺失,而且染色体能通过加入末端重复序列而重新愈合。由于这种寄生虫基因组的 10% 位于端粒区 100kb 之内,所以染色体远端的断裂会影响到许多的基因。

通过对 *HRP I* 和 *HRP II* 基因断点的分析,人们发现在所有断点的 5bp 内,除存在 CA 二核苷酸外,很少具有相似性。

这样的序列元件还见于 *KHARP* 基因,该基因中染色体断裂位点的详细图谱显示其周期为 155bp,相当于核小体间隙。当该基因中核小体的位置被确定后,考察它们的状态和定位,发现染色体断裂位点与核小体连接区相一致(Lanzer et al. 1994)。或者断裂被局限在这样的区域内,该区域的愈合限定在含有二核苷酸 CA 的范围内,这可能是由于序列特异的内切酶作用的结果,或者随机断裂后,愈合只能发生在连接区 CA 二核苷酸位置。愈合/断裂位点相等的限定,无论在 α -珠蛋白基因座还是端粒相关染色体片段表现均不明显(见下文),但这可以反映出这些系统缺乏核小体相,同时也缺乏实验资料。

虽然这种基因组变化对于生物体的意义尚不清楚,但这类很容易观察到的缺失成分可能是某种机制的组成成分,该机制可将基因由沉默位点移到表达位点,就像在锥虫体内一样。有可能双链断裂可以作为配子发生的启动信号(Barale & Langsley 1993)。

酵母和哺乳动物人工染色体中的断裂愈合

在酿酒酵母中,人们可通过导入酵母或其他生物的端粒序列来操纵染色体。将一端带有端粒序列并与酵母基因组内部位点同源的 DNA 分子进行同源重组,可引起染色体片段化,并能在输入端粒序列上加上新的端粒(Surosky & Tye 1985)。带着丝粒的片段被分离并保留,而无着丝粒部分丢失。用带有反向端粒重复序列构建合适的载体,也可以将着丝粒导入无着丝粒片段,从而使两种染色体片段都可以保留在细胞内(Vollrath et al. 1988)。

通过确定断裂的染色体并测量其产物的长度,以获取粗略的图谱位点,这种在酵母中

的基因组操作方法已被用来绘制染色体 DNA 序列的物理图谱(Vollrath et al. 1988)。由于酵母遗传学研究的深入能够通过同源重组精确地操作基因组的小区域,所以这种方法已没有太大的实用意义。最近在酵母的断裂和愈合实验中获得的最重要的结果来自于对愈合点周围的序列的详细分析(Kramer & Haber 1993)。在染色体 III 邻近 *MAT α* 基因座内,整合入一个带有短端粒部分(telomeric seed)、一个标记基因和一个细菌质粒的构建体,就可以在 *MAT* 基因座上利用 HO 内切核酸酶切开染色体,在没有 *RAD52* 依赖性重组存在时,跟踪染色体的变化。

这些染色体的愈合效率并不高(0.2%~1%),部分原因是由于种子构件(the seeding construct)和断裂点间有 10kb 的距离,但愈合还要求所整合的构件上有端粒种子的存在。回收的末端缺失染色体带有新加入的端粒序列,并对加入重复序列的位点进行了序列分析。这一分析的重要结果是两个相关序列中(ADD1、GTGTGGGTGTG 和 ADD2、GTGTGTGGGTGTG)有一条链加到了引发位点上,或是引发位点和加入的新序列连接点之间形成了 ADD1 或 ADD2 序列。对该资料最简单的解释就是酵母端粒酶的 RNA 模板含有 ADD1 和(或)ADD2 的互补序列,可以作为后加入的重复序列的模板,并且模板和端粒的不同序列排列引起天然酵母端粒中的序列差异(见图 8-1)。酵母端粒酶 RNA 基因的克隆结果已经证实了这些假设(Singer & Gottschling 1994;Greider 本书)。

在哺乳动物中遗传学操作能力比酵母弱很多,这是因为传代时间更长,交换过程中重组的数量有限,而且可选择标记相对贫乏。同源重组是更罕见的过程,而且其基因组比酵母的大 200 倍。由于这些原因,如果有一种能操纵哺乳动物染色体的方法,就会弥补现有体细胞遗传学方法的不足。另外,能操纵哺乳动物染色体还有来自经济和临床上的需要。

现在证明脊椎动物端粒 DNA 重复序列为 TTAGGG(Moyzis et al. 1988),通过用已克隆哺乳动物的端粒或利用(TTAGGG)_n 寡核苷酸的连接还可以合成端粒(Brown 1989;Cheng et al. 1989;Cross et al. 1989;de Lange et al. 1990),这些都使哺乳动物细胞中的比较实验成为可能。一个简单的构件(一端带有方向正确的末端重复序列)和一个抗药性基因可以随机整合到哺乳动物细胞基因组中。如果该端粒序列能够萌发端粒,那就会在细胞核型中产生可见的变化;如果这一过程伴随有无着丝粒片段的缺失,则会导致远端标记丢失。然而,如果染色体断裂所产生的新端粒导致使细胞生存所必需的二倍体的基因丢失,那么,新端粒将会限定在染色体的末端位置,这是诱导末端断裂后,带有断裂近端的细胞选择的结果。这些远端缺失的序列在细胞学水平上很难检测,而且预计丢失的标记物数量也很低。在上述的第一个实验中,其目的是把端粒构件定向重组到杂交细胞系中所谓不重要的基因组区(人 X 染色体的假常染色体区)(Rouyer et al. 1986)。该细胞系只含有人 X 染色体的单个拷贝,所以很容易检测出标记物丢失。永生化细胞的情形则有所不同,它们通常是非整倍体。尽管观察到了正确的定向重组,但这些重组并没有导致端粒形成,而是端粒构件嵌入所定向的 *MIC2* 基因中。然而,在本实验的非定向细胞群中,约有 20% 的细胞染色体上带有添加的端粒构件,该构件在染色体上起到了添加端粒的作用(Farr et al. 1991)。在这些细胞中,可以通过原位杂交在单条染色体末端检测到导入的 DNA,它存在于大小不等的片段中,比含有导入的端粒构件的片段要大一些(这两种情况可能是加入不同数量端粒重复序列的结果)。此片段由于外切核酸酶的消化作用(消化完整的基因组 DNA)而缩短,这是基因组所有分子末端定位的判定标准。

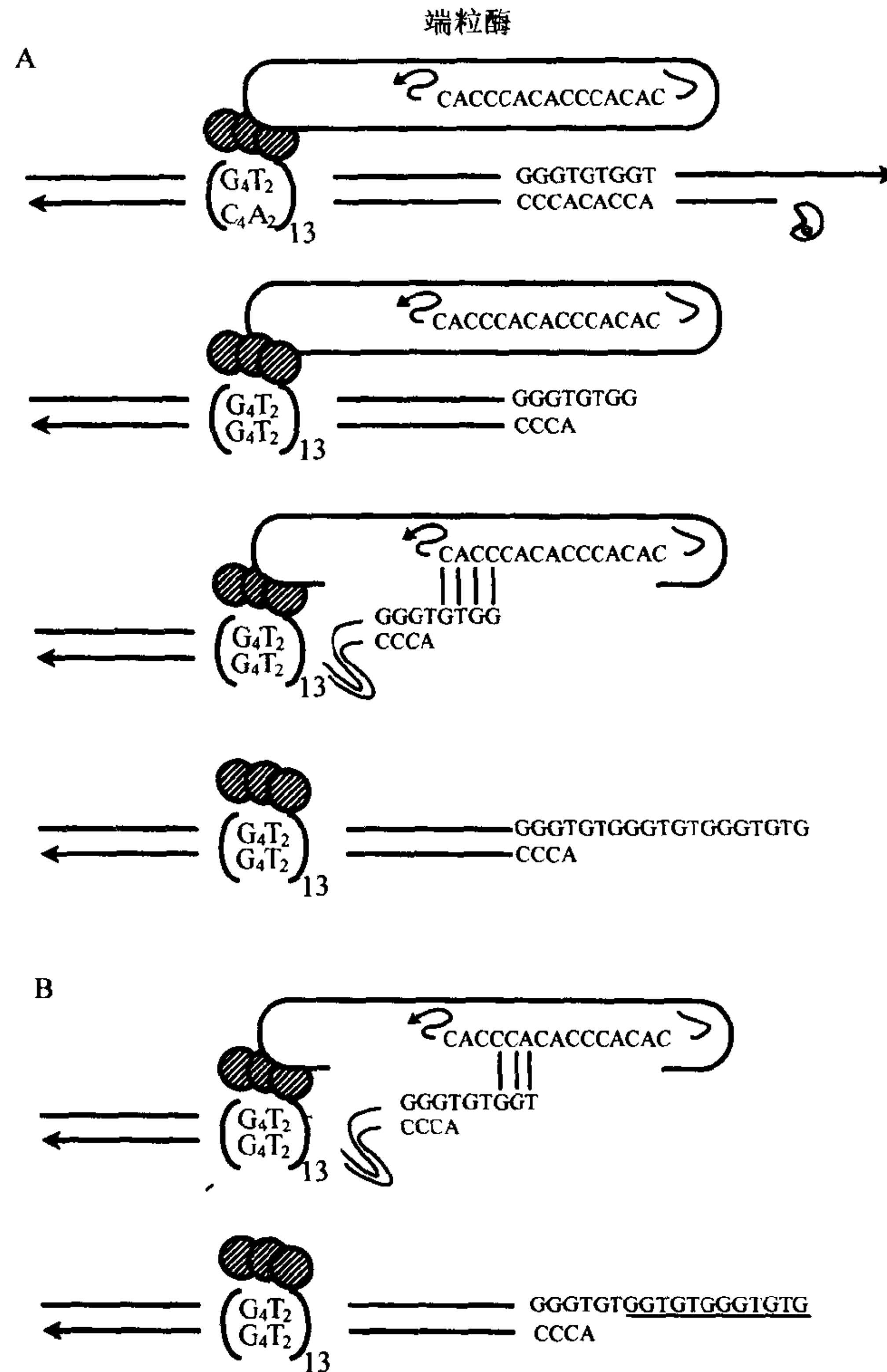


图 8-1 以引发位点和端粒酶 RNA 之间的有限配对为基础,通过引物延伸形成的酵母端粒

A 中,外切酶降解形成以 GTGG 序列为末端的引发位点,该末端可以和模板 RNA 配对,并导致 ADD1 序列 GTGTGGGTGTG 的加入。B 中,与模板序列内部配对,从部分引发序列产生 ADD1 序列。在模型中,内部 T₂G₄ 片段或与之相结合的蛋白质成为端粒酶蛋白的识别位点。

在染色体的中间位点上萌发一个新的端粒,或通过重组就可产生一个末端。这可能是由端粒构件上的末端重复序列所介导的,最后在已经存在的末端位点中插入了新的 DNA。端粒构件导入前后,对细胞系的染色体进行细胞学检查,发现在一些情况下确实发生了染色体断裂。很有可能通过质粒补救,在新端粒位点恢复基因组 DNA。对整合后的三个这样的位点进行测序,发现没有末端重复序列的同源性,该结果支持了(但不能证实)这是断裂模式,而不是重组模式(Bayne et al. 1993)。

尽管哺乳动物细胞中很少发生同源重组,仍可应用选择系统分离发生重组的细胞。Porter 等人将这种方法和端粒相关染色体片段化结合起来,将一个端粒定向到人 1 号染

色体的干扰素效应基因(interferon-responsive gene)上(Itzhaki et al. 1993)。这些实验中的 1500 个转化子中约有一个被定向重组。在 8 个定向重组克隆中,一个产生了端粒的萌发和远端 DNA 的丢失。所以端粒定向重组不仅为确定的染色体末端序列缺失提供了方法,而且还证明了以着丝粒为参照的基因方向,因为这决定着基因是位于染色体的着丝粒还是无着丝粒片段,进而决定其是否留在细胞内。

定向和非定向断裂以及愈合发生的频率很可能受到参与端粒代谢的核蛋白水平的影响。通常在未转化的原代细胞中检测不出端粒酶的活性(Counter et al. 1992)。如果愈合过程可能会与外切核酸酶降解或者与游离 DNA 末端发生异常重组发生竞争,那么哺乳动物中永生化细胞系的低活性水平则会降低这一愈合过程的频率。端粒酶不是参与端粒代谢的惟一的蛋白质。端粒最末端有一种可变的染色质结构,表明末端结合蛋白可能在端粒形成时非常重要,并且如果结合的发生频率低于降解或重组,那么这些蛋白质水平的低下可能会使所导入的短端粒降解,而不是愈合。细胞愈合外源性萌发端粒的能力变化很大,很多已经构建的细胞系能有效地愈合,但也有一些不能。Brown 和他的同事们(Barnett et al. 1993)在人胚胎原代成纤维细胞系中未检测到愈合,但却发现鼠胚胎干细胞不仅愈合效果好,而且还可以产生延长(25~75kb)的萌发端粒,与鼠体内端粒大小很接近(Kipling & Cooke 1990),而在其他细胞系中正常长度为2~4kb左右。这与下面的观察结果一致:端粒酶在转化细胞和 ES 细胞中具有活性,但在原代培养细胞中一般检测不到(Counter et al. 1992)。

其他可以影响端粒导入效率的因素还有导入端粒 DNA 的结构和序列,如果愈合与降解有竞争关系,那么端粒种子的长度就显得很重要。大多数的实验都用 0.4~3.0kb 的末端重复序列进行。在该范围内,愈合的频率变化范围在 25%~70%,表明长度(至少在 0.5kb 以上的水平)对愈合过程没有很大的影响(Hanish et al. 1994)。

在酿酒酵母中,端粒萌发时的序列要求比较低,许多生物(包括哺乳动物)的末端重复序列都可以作为有效底物加入酵母末端重复序列(很可能是通过端粒酶机制),这反映出酵母端粒的简并属性以及酵母端粒酶在不同位点与末端 DNA 序列配对的能力(Kramer & Haber 1993)。利用酵母人工染色体(YAC)作为哺乳动物细胞基因的转移载体,在哺乳动物细胞中从未发现产生带有端粒的线形 DNA 分子,最终总是导致 YAC 整合到宿主细胞基因组(Featherstone & Huxley 1993; Gnirke et al. 1993; Taylor et al. 1994)。YAC 末端的序列最易丢失,这说明哺乳动物细胞在形成端粒时并不利用酵母端粒作为端粒萌发的底物。我们知道如果 YAC 保持非整合,那么它起码应该进行复制,因此除了端粒功能以外,一定还有其他因子的参与。因为利用端粒酶在体外进行模板延伸时,对序列的要求不严格(Morin 1991),因此看来端粒酶不大可能是端粒序列添加效率的惟一决定因素(Hanish et al. 1994)。

序列对端粒形成效率的影响的研究,有的是从重复序列的角度,有的是从重复序列相对于分子末端位置的角度进行的。正如酵母中见到的那样,末端重复序列不需要位于 DNA 最末端。长度较短的多聚接头序列常常在构件中位于离端粒重复序列较远的位置,在这一位点它们被导入哺乳动物细胞之中。Brown 和他的同事们(Barnett et al. 1993)在很多萌发试验中分析了此序列保留的现象,发现愈合发生位置有一定范围。其中一些除了 4bp 单链序列延伸外,保留了位于 TTAGGG 序列远端的所有非端粒 DNA。较长一些的

远端片段达到 900bp,并未明显降低端粒形成的效率。但此类 DNA 在细胞系中的滞留尚未在实验中得到证实(Hanish et al. 1994),这与酵母中发现的情况完全相同(Murray & Szostak 1986)。

端粒形成时,对末端重复序列位置要求并不严格,而对重复序列本身却有很高的限制。来自多种非脊椎动物的相关重复序列,如 TAG₃、T₃AG₃、T₂AG₅、T₂G₄ 和 T₂AG₂C 端粒重复序列,引发端粒形成的效率很低,或根本不能形成端粒(Hanish et al. 1994)。这种对序列要求的严紧性,明显地与端粒酶在体外利用这些序列的能力不相一致。但却与人端粒蛋白 TRF 的高度序列特异性相吻合(Zhong et al. 1992),这种蛋白质能与脊椎动物的末端重复序列结合,条件是序列处于线性分子或环状质粒内部,但不与上述相关重复序列结合。很可能是这种序列的特异性,而不是末端重复序列位置的差别反映出这种蛋白质确实参与了端粒的形成(Hanish et al. 1994)。

基因组图谱绘制中端粒相关的染色体断裂

绘制完整的哺乳动物(无论是家畜还是人类)或者植物的基因组图谱,主要目的是从医学和经济需要出发去定位、了解基因,也许最终操作基因。这些基因通过产生常见疾病或控制诸如耐盐性或杀虫剂的抗药性等生物学性状来影响这些生物。因此拥有基因图谱非常重要,通过它可以找到多基因性状或疾病的组分,这比单基因引起的疾病或性状更重要。在高信息度的 CA 重复标记的基础上,现已有很多技术被用来绘制人类和鼠的基因图谱(Gyapay et al. 1994)。YAC 则一直被用来产生整个染色体或全部基因组的物理图谱(Cohen et al. 1993),现在已经将这两种方法结合起来用于研究。人类染色体的深入研究已经获得了许多具有细胞遗传学特征的异常染色体,可以用于初步排列 DNA 标记。存在于体细胞杂交株中的此类染色体,提供了有力的图谱绘制工具,可以从一个实验室转到另一个实验室,从而提供标准的、可以用来锚定图谱的断点或缺失序列。现在已构建了人染色体和人重排染色体的杂交株,但对大多数哺乳动物(尤其是人)来说,还相对缺乏在分子水平上确定的染色体断点。在人类基因图谱的绘制过程中,特别是对于大的染色体(如 1 号染色体),还需要大量的断点以利于绘图的完成。

在末端缺失的染色体上产生端粒的能力是一种很有潜力的方法,可用来收集末端断裂的染色体。末端缺失可以方便地用于图谱绘制,因为图谱可以从这个末端开始,而且是单向的,图谱的距离和分辨率受现有技术控制。从 X/Y 染色体假常染色体端粒制得的亚末端探针,首先被用于这个目的,但这种染色体特异性的探针很少。如果用端粒相关染色体片段化(TACF)制备,那么在一组用单一载体制备的所有染色体的末端都可以利用一个探针进行图谱绘制。为了检测这种方法的可行性,有人把人类 X 染色体当作一种模型系统(Farr et al. 1992)。这条染色体是一个特别适合的模型,因为该染色体长臂远端上的 *HPRT* 基因是为数很少的哺乳动物生化标记之一,能够用于正反两个方面选择。利用短臂上的可选择标记物来锚定杂交细胞的染色体,选择抗含 *HPRT* 基因的细胞同时,还筛选端粒构件中的标记物,就可以将发生了端粒相关染色体片段化的染色体筛选出来,从而用上述标准检测 DNA 构件上端粒的位置。

用这种方法,已经建立起代表 X 染色体长臂缺失的一组细胞系,并且在序列标签位

点 (sequence tagged site, STS) 标记物 (PCR 引物在人基因组中的特定位置) 丢失的基础上, 这些细胞系中大部分都表现出 X 染色体单纯末端缺失 (Farr et al. 1992)。这些细胞系缺失的染色体中都有一条在每个末端都带有可选择标记的染色体, 通过两种标记的选择, 使染色体保留在细胞群中。这种选择有时不是必要的, 很多带有用这种方法构建的人工端粒的细胞系, 在没有选择的情况下, 已经在培养基中传了数百代, 染色体的丢失率并不高于同一细胞内的正常染色体。相比之下, 其他使染色体片段化的方法, 如辐射融合杂交体, 并不能产生这种快速稳定的核型。辐射后存活细胞融合所产生的杂交组合, 其功能是有限的, 利用这种技术可对进化核型有初步了解。这些细胞系中的染色体在不断地变化, 但只要可以采用以 PCR 为基础的方法, 就不存在很大的限制。

对于 X 染色体长臂的 TACF 产物进行详细分析发现, 此技术有一很大的局限性, 至少在实验中所用的 CHO 背景是这样, 在其他细胞系中可能也是如此。实验中所采用的载体的构建, 要保证 X 染色体末端部分可以回收到大肠杆菌中 (通过把它作为含有质粒复制起始点和氨苄青霉素抗性基因的限制片段进行环化)。当这种收集到的 DNA 序列被作为探针, 对分离的细胞系的 DNA 印迹测定时, 很明显, 许多检测的片段不仅是同源片段, 而且是亲本片段, 因为细胞中仅含有一条 X 染色体, 这说明重复发生在断裂前。通过测定这些重复的序列在原来 X 染色体的位置, 发现它们起源的位点比通过标记物丢失所测定的断裂位点更近。综合来看, 这些结果与染色体的大量反向重复相一致。在个别情况下, 如果把末端克隆序列用作探针, 这种重复序列就会大到足以产生两个独立的信号, 并产生一个小的, 但可见的核型重复序列 (H. J. Cooke & E. Thomson 个人通讯)。根据缺失末端和从细胞系回收的末端序列间在图谱上的定位差别, 估计所产生的重复序列的大小可能为 1~2Mb。总的说来, 约有 80% 的细胞系表现有反向重复序列。未进行断裂选择的细胞系出现的亲本和同源片段的量表明重复发生在没有选择时, 而不是选择产生了重复。

出现这样大的反向重复的一种可能机制如图 8-2 所示。如果染色单体断裂后发生复制和融合, 首先出现的就是以断裂点为中心对称的双着丝粒染色体。随后是断裂-融合-桥 (BFB) 循环, 直到一个断裂产物通过加入端粒 (来自端粒标记物构件) 而愈合。这种解释有一个问题, 就是应该得到等量的重复与非重复的染色体, 但实际却未能见到这种现象。另一种推测是, 在该过程通过愈合终止前, 可能发生多次 BFB 循环, 而且这种循环可能获得实质扩增的染色体, 而不是更简单的反向重复序列 (这是所收集到的主要部分)。事实上, 在这些端粒断裂实验中已经观察到了这样的染色体, 所涉及的机制与基因扩增的机制很相似 (Smith et al. 1992; Ma et al. 1991; Stark 1993)。

CHO 细胞内早期阶段基因扩增表明, 有兆碱基的大片段反向重复序列在产生扩增基因的染色体上形成 (Stark 1993; Toledo et al. 1992, 1993)。扩增的双着丝粒染色体和环状染色体的结构与它们在一染色单体基础上的 BFB 循环起始过程的衍生物一致。可能 CHO 细胞出现这种情况的频率更高, 于是基因扩增频率也很高。BFB 发生的频率可以认为是细胞系愈合频率的主要决定因素。但如上所述, 频率变化的范围很小。这可能意味着染色单体 BFB 的发生频率不是通过端粒萌发构件发生愈合的速率的主要决定因素, 或者意味着其他细胞系也有相同的染色单体 BFB 形成率。萌发位点上的大量反向重复序列的存在并未见于其他细胞系, 但总的说来, 这可能是由于实验设计不够合理, 不能观察到这种变化。大多数细胞系都是非整倍体, 而且倍性的变化可能在细胞培养中发生。如果检测

作为一种图谱绘制工具,端粒相关染色体断裂很可能特别适用于已知端粒序列的生物体基因组分析的早期阶段。这类生物基因组很大,但却表现出极少的经典遗传学特性。植物与脊椎动物末端重复序列的相对保守性,意味着这种方法可以用于许多不同的物种。

染色体操作

最小的染色体必须具备复制和准确分离的信号。如果染色体为线性,还需要一些阻断染色体末端重组以及进行末端复制的方法。染色体更加微妙的特点在于它能够影响基因表达,这种表达取决于与端粒和着丝粒等特性有关的基因的位置。尽管已知酿酒酵母中有很多成分,包括 DNA 和蛋白质,都参与了这些过程(Shore 本书),但对高等真核细胞,如哺乳动物细胞则知之甚少。例如,还不能利用在酵母中运用的遗传方法来确定哺乳动物细胞的 ARS 成分。哺乳动物着丝粒序列主要由很大的串联重复序列的排列构成(Wolfe et al. 1985),其中有些为其功能元件的一部分(Haaf et al. 1992),但在不同哺乳动物物种间无明显的保守性。端粒的情况则相反,它们的序列不仅已知,而且在所有脊椎动物中都非常保守,并且,如上所述,当端粒被导入到哺乳动物细胞以后,则会发挥功能。它们为在细胞内操作染色体提供了工具,也为建立哺乳动物人工染色体奠定了基础,这种人工染色体的建立方式与 YAC 构建方式类似(Burke et al. 1987)。

体内染色体操作

在光学显微镜下,哺乳动物染色体的着丝粒在中期呈主缢痕,在电子显微镜下则呈复合多层结构,为微管的附着部位。现已鉴定出几种蛋白质成分,至少有一种(CENP-B)为 DNA 结合蛋白(Sullivan 1992;Yoda et al. 1992)。在大多数哺乳动物中,着丝粒与异染色质特别靠近,后者主要由串联的重复卫星 DNA 序列组成。功能性哺乳动物着丝粒形成所必需的序列尚未确定,部分原因是由于尚无适合于哺乳动物细胞的染色体外载体。最佳候选对象是人白斑样和鼠小卫星 DNA 序列,这些序列含有 17bp 共有的结合位点,可供 CENP-B 蛋白质结合。导入哺乳动物细胞内的白斑样序列表现着丝粒结构的一些特点,如缢痕和可被 CREST 抗体(结合着丝粒抗原)染色等(Haaf et al. 1992)。正常染色体的分离常受到破坏,但尚未证明这些导入的序列可以促使分离。

细胞内染色体的操作可以提供一种有价值的方法,通过碱基缺失手段阐明着丝粒 DNA 的需求问题。由 Farr 等人所做的实验(1992)(如上文所述)产生出很多细胞系,其中,从细胞遗传学角度讲,X 染色体的长臂都已缺失(见图 8-3a)。在一些细胞系中,对愈合端粒附近序列的分析表明,断裂发生在白斑样 DNA 内部。随后的脉冲电场凝胶电泳分析表明,在一个细胞系中,有 1/3 的白斑样序列已经丢失。尽管如此,细胞系中的 X 染色体在没有选择存在的情况下进行了分离,与其未缺失的亲本染色体一样,表明着丝粒的功能无需完整的白斑样 DNA 序列(Bayne et al. 1994)。在更详细的分析实验中,将端粒愈合构件定向整合到 Y 染色体白斑样 DNA 上(采用白斑样重复序列的两种方向),衍生的细胞系带有截短的白斑样序列并只有长臂或短臂序列。这两种染色体在细胞有丝分裂时均忠实地分离,但含有 Yq 的染色体在向纺锤体极移动时滞后于其他染色体。而 Yp 衍生物

不表现上述行为,表明 Yp 含有参与着丝粒功能的序列,因此着丝粒并非仅仅含有均质白斑样 DNA (Brown et al. 1994)。

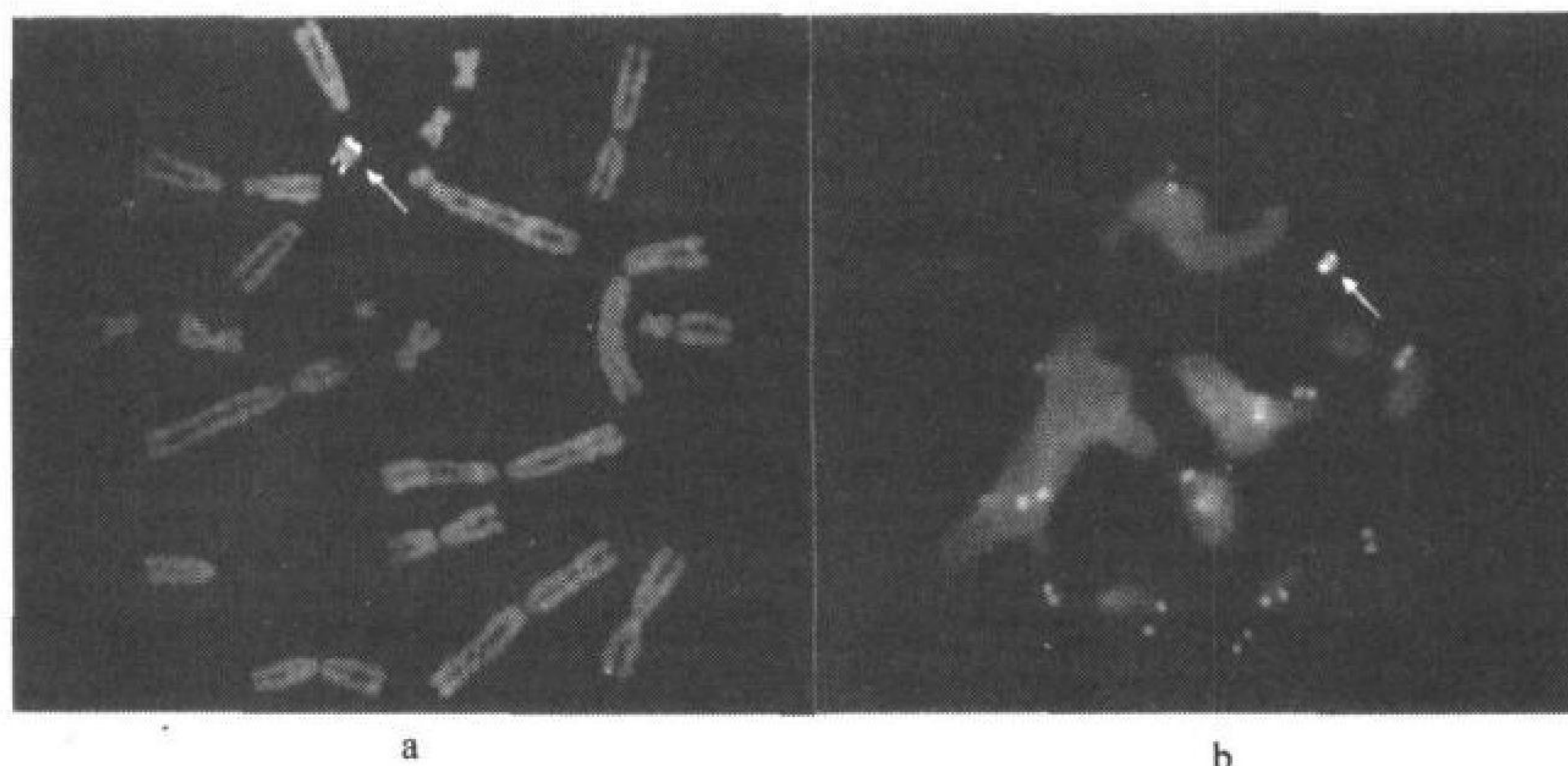


图 8-3 人 X 染色体的端粒相关染色体断裂产物

a. 长臂缺失的 X 染色体(箭头所指),与 MIC 探针原位杂交,该探针可以探测出伪常染色体区内的片段化载体和内源性 MIC 基因;b. 染色体进一步片段化产生微染色体。染色体用 DAPI 和 CREST 抗血清染色,可见动粒。

随着缺失从一侧延伸到着丝粒区,这些 X、Y 染色体缺失产物成为进一步导致这些染色体残臂缺失的有力工具。只要精心设计使之产生多次断裂并对所产生的染色体进行分析,就能够对着丝粒功能缺失进行分析。X 染色体第二轮断裂时,产生带有人工端粒的微染色体,还带有 X 着丝粒侧翼的可选择标记和掺入在一起的酵母 CEN 与 ARS 元件(见图 8-3b)(C. Farr & R. Bayne 个人通讯)。将酵母染色体的必需成分组合到端粒断裂构件中,则能使这些缺失染色体转入到酵母中,以便作进一步分析或操作。

活体内染色体修饰可以被用来研究端粒位置改变对细胞中染色体定位作用的影响,以及这种改变对端粒附近的基因表达的影响。哺乳动物细胞的间期核呈有序结构,与很多功能(如复制和剪接)有关的蛋白质占据不同的结构域,后者可能与染色体特定区域相关。有证据表明,在不同物种的细胞内染色体有自己特定的位置(Dernburg et al. 本书)。在某些神经细胞内,正常排列的改变和疾病有关。已有报道称,端粒趋向于核外周分布,一些着丝粒与核仁相连,而另一些可能处于核浆中或在核膜上(Dernburg et al. 本书)。直到最近还不能对人细胞中的单个端粒和着丝粒进行分析,但利用上述实验中所产生的 X 染色体片段,可以对带有正常 X 染色体和不同程度长臂缺失的细胞株进行分析,分析它们的 Xp 和 Xq 端粒的位置及着丝粒的位置(Broccoli & Cooke 1994)。另外由于端粒愈合构件附近的 DNA 已被克隆,因此可以将该基因座在中间位置与末端分布时在核的位置加以比较。这一实验的结果表明,在染色体(Xq)长臂的切除前后,Xp 端粒有一个内部核位置。尽管很相似,但是染色体在 Xq 臂断裂后更靠近内部了,说明这两种端粒间存在相互作用。Xq 端粒的定位受侧臂切除的影响不明显,所以这两种端粒间的相互作用肯定是间接的(Broccoli & Cooke 1994)。

酵母中,邻近端粒处会产生位置效应,使本区域内的基因沉默(Shore 本书)。解释这一现象的一种可能机制是异常的染色质构象从端粒扩散到这一基因。这被认为与接合型

基因座的沉默相似,而且很多参与这个正常过程的基因,还会对位于端粒的其他基因的位置效应产生影响(Shore 本书)。在哺乳动物中,端粒到最近的基因之间的距离还不清楚。如果说,处于端粒附近的基因控制细胞增殖,那么末端重复序列的缺失,理论上会使位置效应差异(position effect variation, PEV)带内的基因受影响,使之沉默,导致细胞逃逸衰老。其他位于端粒附近的基因沉默后,可能引起遗传疾病,如筋膜肩胛肱肌萎缩(Bengtsson et al. 1994; Hewitt et al. 1994)。这一观点得到了其他方面的认证:人们发现鼠和人细胞的长端粒表现出一种核小体形态。虽然比正常重复序列的 146bp 要短一些,并对核酸酶消化极为敏感,但看起来是由规则包装的组蛋白八聚体区域所形成(Makarov et al. 1993)。在有些细胞系内的短端粒情况与上述不同(Tommerup et al. 1994)。有证据表明,它们可能存在无核小体区域(Fang & Cech 本书)。很有可能靠近这些末端区域会引起基因的沉默。因为这个域很短,约为 2kb,哺乳动物基因正常情况下不会距端粒这样近,但是 TACF 可以将可选择标记基因置于短端粒的 1kb 内。

所有的断裂/愈合实验指出标记基因的表达不会因与新端粒的接近而沉默。由于愈合的染色体其功能常常得到恢复,看来这一假设是正确的。一个更极端的例子是标记基因与端粒和着丝粒都接近。着丝粒为异染色质成分,为基因组的高度凝聚区域,并被高度甲基化,在细胞周期的晚期才复制。所有这些特点表明这一区域的转录会受到阻抑,而且插入到该区域的基因也容易沉默。然而对带有白斑样 DNA、可选择标记基因和 12kb 间隔内的端粒的细胞系进行回收,表明沉默并未发生(Bayne et al. 1993)。为了排除非必需基因逐渐沉默的可能性,人们将这些细胞系放在无药物抗性标记选择的培养基中生长。经过 100 多次细胞分裂,这些细胞仍然在选择性培养基上生长,与长在选择条件的细胞相同。通过转录水平的分析证明转录沉默的缺乏:端粒标记基因在无论有无选择的情况下,以及同一基因位于内部位置上,其转录水平都是类似的,这表明哺乳动物端粒的位置效应在染色体片段化或染色体构建中不必考虑(见下文)。

在酵母中的实验和在哺乳动物细胞中的实验差别较大。首先在酿酒酵母中,URA3 基因可以用来作为正反向选择标记物,这样就有可能测定出两种状态互变的低水平转换频率。采用药物抗性标记物,只能够选择关-开方向;第二,在酿酒酵母中只有弱的启动子才表现出端粒的位置效应,但哺乳动物实验中常用的都是强的病毒启动子。利用 TACF 构件,使其带有 HPRT 基因,并带有哺乳动物细胞的弱启动子,就很有可能实现更有可比性的系列实验,选择出能够控制 HPRT 基因表达转换的细胞群体。在进行这样的实验时,很有可能选择出能在对 HPRT 表达正反选择条件下和状态转换条件下生长的细胞系(D. Broccoli & H. J. Cooke 未发表)。具有这方面行为的细胞系表现出能与端粒或者与着丝粒区整合,这两个区域均被认为是特征性异染色质区。然而,对 RNA 水平的分析表明,此处存在低水平(也许阈值水平)的基因表达,顶多在“开”或“关”群体中有微小的变化,但足以产生表型转换。

那么很清楚,在这些实验情况下,端粒的位置效应在哺乳动物中不明显。在哺乳动物端粒较长,近端重复序列相对正常的染色质说明,基因可能与染色体末端的距离太远,以至于在哺乳动物中不能表现出端粒位置效应。

哺乳动物人工染色体的构建

不采用对现有染色体缺失进行分析的方法,要了解哺乳动物染色体功能所需成分的另一条途径,是用各个组分构建一个染色体。因为端粒是仅有的、可以得到的、功能明确的元件,其作用至关重要。染色体断裂和愈合为端粒形成提供了必要的信息,以便应用在哺乳动物人工染色体的开发中。大多数措施都以 YAC 构件的应用为基础,因为来自酵母的迹象表明,染色体正确的功能可能有最低长度的限制。哺乳动物着丝粒的大小估计为数百 kb(取决于人不同染色体白斑 DNA 的数量)。端粒萌发具有严格的序列特异性,这表明酵母端粒不能在哺乳动物细胞中起作用,必须有人的端粒存在。由于酵母常常用酵母端粒重复序列给天然哺乳动物端粒加帽,通常只留下几百对碱基的哺乳动物序列,因此有必要探讨,当被这样的加帽序列移入哺乳动物细胞内时,它们是否具有功能,或者在这种杂合端粒能够在哺乳动物细胞中萌发端粒结构之前,是否需要除帽过程。Taylor 等人(1994)和 B. Grimes 等人(个人通讯)探讨了这方面的问题,他们将 YAC DNA 导入哺乳动物细胞内,测定端粒的形成频率。当酵母端粒序列位于人序列远端时就会发生片段化和愈合,但与终止于脊椎动物末端重复序列的构件相比,频率较低。由于线性分子存活要求有两个萌发过程,因此存活率下降到 2%~11%可能会明显降低上述过程的发生频率,但无须除去酵母重复序列。这种观察的一个重要结果就是,有可能将来源于酵母的人工染色体导入到哺乳动物细胞内,然后再返回来,采用酵母细胞作为同源重组染色体修饰和检查哺乳动物细胞内可能发生的变化(例如三联体重复序列延伸等)的适宜宿主。如果染色体片段化和通过端粒愈合的能力转化到哺乳动物细胞内维持线性 DNA 分子的系统中,将有可能利用该系统发展一个体内功能试验,以在染色体 DNA 接近正常状态下检查有关着丝粒和复制起始点。

小结

从染色体稳定性的角度出发,真核细胞可分为两大类。在很多高等真核细胞中染色体是稳定的。在灵长类中,这种稳定性导致了染色体进化的一个途径,这可以利用细胞遗传学分带做为标记物加以追踪。如果频繁发生断裂和融合,并引起快速的核型重排,则这种方法不可行。即使是在较大一些的进化距离,如鼠与人之间,仍然保留基因的连锁群,还可以描绘出两个物种染色体之间相对简单的关系图。当这些种群中发生染色体断裂时,结果将非常严重,可以引起染色体丢失和(或)基因扩增。只涉及到几个基因的轻微的染色体变化,如果它们已经稳定化,那么尚可以忍受。在 α -珠蛋白基因座加入端粒而实现的愈合就是这方面的一个例证。尽管人基因组中有很多脆性位点,但尚未见到通过在这些位点上加入端粒来挽救断裂产物的报道。可能这些位点上的断裂机制或产物的性质使端粒添加很难,但是这些位点的细胞遗传学精度(definition)意味着已有大片染色体区域丢失。所导致的 DNA 丢失很危险,以至于即使断裂的染色体愈合了,细胞也不能存活。

第二类真核细胞基因组的典型代表是疟原虫,端粒添加之前、断裂介导的重排经常发生,并导致同一物种的分离物有不同电泳染色体核型。由于低等真核细胞的基因组

中,基因组的大部分都在端粒的附近,因此很容易引起死亡,而且所观察到的端粒位点中易于发生断裂的倾向也可能反映出这一点。这种明显的核型变化的生物学功能还不清楚。

疟原虫和哺乳动物中通过加入端粒来进行愈合是染色体断裂后的常见现象,并且研究发现向细胞内加入外源端粒会有效的,这有助于我们理解染色体断裂以及基因扩增的有关过程。尽管愈合涉及到很多因素,如端粒酶、端粒结合蛋白等,但愈合与断裂的偶联机制尚不清楚。一个简单的模式是单个非同源重组过程同时产生了一个断裂和一个序列,该序列可以高效引发端粒形成。然而详细跟踪此过程中的分子本质后,发现通常会有重复序列发生,这也许是获得预先存在的断裂-融合-桥循环产物的结果。

现在我们能够开始操纵细胞内的染色体,从而使某部分基因组缺失,目的也许在于创造新的先天性疾病综合征,或是建立现有综合征的模型,或者跟踪缺失对染色体造成的影响。染色体末端区域的精确定向缺失,从理论上讲也可以在胚胎干细胞中产生,从而追踪它们对嵌合鼠减数分裂期配对和分离的影响。染色体两臂大量缺失最终可以确定着丝粒的边界与作为复制起点的序列要求。这将完成染色体功能所需的一整套 DNA 成分,而且通过将端粒、着丝粒和复制子结合起来,可建立起哺乳动物人工染色体。

参考文献

- Barale, J.C. and G. Langsley. 1993. Molecular basis of karyotype polymorphism in *Plasmodia*. *Methods Mol. Cell. Biol.* 4: 56-62.
- Barnett, M.A., V.J. Buckle, E.P. Evans, A.C.G. Porter, D. Rout, A.G. Smith, and W.R.A. Brown. 1993. Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 21: 27-36.
- Bayne, R.A.L., D. Broccoli, M.H. Taggart, E.J. Thomson, C.J. Farr, and H.J. Cooke. 1994. Sandwiching of a gene within 12 kb of a functional telomere and alpha satellite does not result in silencing. *Hum. Mol. Genet.* 3: 539-546.
- Bengtsson, U., M.R. Altherr, J.J. Wasmuth, and S.T. Winokur. 1994. High-resolution fluorescence in-situ hybridization to linearly extended DNA visually maps a tandem repeat associated with facioscapulohumeral muscular-dystrophy immediately adjacent to the telomere of 4q. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1801-1805.
- Blackburn, E.H. 1992. Telomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 113-129.
- Broccoli, D. and H.J. Cooke. 1994. Effect of telomeres on the interphase location of adjacent regions of the human X-chromosome. *Exp. Cell Res.* 212: 308-313.
- Brown, K.E., M.A. Barnett, C. Burgtorf, P. Shaw, V.J. Buckle, and W.R.A. Brown. 1994. Dissecting the centromere of the human Y chromosome with cloned telomeric DNA. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1227-1237.
- Brown, W.R.A. 1989. Molecular-cloning of human telomeres in yeast. *Nature* 338: 774-776.
- Brown, W.R.A., P.J. MacKinnon, A. Villasante, N. Spurr, V.J. Buckle, and M.J. Dobson. 1990. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 63: 119-132.
- Burke, D.T., G.F. Carle, and M.V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812.
- Cheng, J.F., C.L. Smith, and C.R. Cantor. 1989. Isolation and characterization of a human telomere. *Nucleic Acids Res.* 17: 6109-6127.
- Cohen, D., I. Chumakov, and J. Weissenbach. 1993. A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 366: 698-701.

- Corcoran, L.M., J.K. Thompson, D. Walliker, and D.J. Kemp. 1988. Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *P. falciparum*. *Cell* 53: 807–813.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. Lefevre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921–1929.
- Craig, J.M. and W.A. Bickmore. 1994. The distribution of cpg islands in mammalian chromosomes. *Nat. Genet.* 7: 376–382.
- Cross, S.H., R.C. Allshire, S.J. Mckay, N.I. McGill, and H.J. Cooke. 1989. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* 338: 771–774.
- Cross, S., J. Lindsey, J. Fantes, S. Mckay, N. McGill, and H. Cooke. 1990. The structure of a subterminal repeated sequence present on many human chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 18: 6649–6657.
- Degiorgi, C., A. Dalessandro, and C. Saccone. 1992. Mitochondrial-DNA detection and copy number determination in the spermatozoa of the sea-urchin *Arbacia-lixula*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1454–1459.
- de Lange, T., L. Shiue, R.M. Myers, D.R. Cox, S.L. Naylor, A.M. Killery, and H.E. Varmus. 1990. Structure and variability of human-chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10: 518–527.
- Farr, C., J. Fantes, P. Goodfellow, and H. Cooke. 1991. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7006–7010.
- Farr, C.J., M. Stevanovic, E.J. Thomson, P.N. Goodfellow, and H.J. Cooke. 1992. Telomere-associated chromosome fragmentation—applications in genome manipulation and analysis. *Nat. Genet.* 2: 275–282.
- Featherstone, T. and C. Huxley. 1993. Extrachromosomal maintenance and amplification of yeast artificial chromosome DNA in mouse cells. *Genomics* 17: 267–278.
- Gnirke, A., C. Huxley, K. Peterson, and M.V. Olson. 1993. Microinjection of intact 200-kb to 500-kb fragments of YAC DNA into mammalian-cells. *Genomics* 15: 659–667.
- Gyapay, G., J. Morissette, A. Vignal, C. Dib, C. Fizames, P. Millasseau, S. Marc, G. Bernardi, M. Lathrop, and J. Weissenbach. 1994. The 1993-94 genethon human genetic-linkage map. *Nat. Genet.* 7: 246–339.
- Haaf, T., P.E. Warburton, and H.F. Willard. 1992. Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: Centromere protein-binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* 70: 681–696.
- Hanish, J.P., J.L. Yanowitz, and T. de Lange. 1994. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 8861–8865.
- Harrington, L.A. and C.W. Greider. 1991. Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* 353: 451–454.
- Hastie, N.D. and R.C. Allshire. 1989. Human telomeres: Fusion and interstitial sites. *Trends Genet.* 5: 326–331.
- Hewitt, J.E., R. Lyle, L.N. Clark, E.M. Valleley, T.J. Wright, C. Wijmenga, J.C.T. Vandeutekom, F. Francis, P.T. Sharpe, M. Hofker, R.R. Frants, and R. Williamson. 1994. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular-dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1287–1295.
- Ijdo, J.W., R.A.W. Wells, A. Baldini, and S.T. Reeders. 1991a. The origin of human chromosome-2: An ancestral telomere-telomere fusion that maps close to the fragile site at 2q13. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 381.
- Ijdo, J.W., A. Baldini, D.C. Ward, S.T. Reeders, and R.A. Wells. 1991b. Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9051–9055.
- Ijdo, J.W., A. Baldini, R.A. Wells, D.C. Ward, and S.T. Reeders. 1992. FRA2B is distinct from inverted telomere repeat arrays at 2q13. *Genomics* 12: 833–835.
- Itzhaki, J.E., M.A. Barnett, A.B. MacCarthy, V.J. Buckle, W.R.A. Brown, and A.C.G. Porter. 1993. Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human

- telomeric DNA. *Nat. Genet.* 2: 283-287.
- Kipling, D. and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347: 400-402.
- Knight, S.J.L., A.V. Flannery, M.C. Hirst, L. Campbell, Z. Christodoulou, S.R. Phelps, H.R. Pointon, H.R. Middleton-Price, A. Barnicoat, M. Pembrey, J. Holland, B.A. Oostra, M. Bobrow, and K.E. Davies. 1993. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* 74: 127-134.
- Kramer, K.M. and J.E. Haber. 1993. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes Dev.* 7: 2345-2356.
- Kvaloy, K., F. Galvagni, and W.R.A. Brown. 1994. The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 3: 771-778.
- Lanzer, M., S.P. Wertheimer, D. de Bruin, and J.V. Ravetch. 1994. Chromatin structure determines the sites of chromosome breakages in *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* 22: 3099-3103.
- Ma, C., S. Martin, B. Trask, and J.L. Hamlin. 1993. Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate-reductase gene in chinese-hamster cells. *Genes Dev.* 7: 605-620.
- Makarov, V.L., S. Lejnine, J. Bedoyan, and J.P. Langmore. 1993. Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* 73: 775-787.
- Meltzer, P.S., X.Y. Guan, and J.M. Trent. 1993. Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nat. Genet.* 4: 252-255.
- Meyne, J., R.L. Ratliff, and R.K. Moyzis. 1989. Conservation of the human telomere sequence (ttaggg)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 7049-7053.
- Morin, G.B. 1991. Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. *Nature* 353: 454-456.
- Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, and J.R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA-sequence, (ttaggg)_n, present at the telomeres of human-chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6622-6626.
- Murray, A.W. and J.W. Szostak. 1986. Construction and behavior of circularly permuted and telocentric chromosomes in *Saccharomyces-cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3166-3172.
- Murray, A.W., T.E. Claus, and J.W. Szostak. 1988. Characterization of two telomeric DNA processing reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4642-4650.
- Nancarrow, J.K., E. Kremer, K. Holman, H. Eyre, N.A. Doggett, D. Lepaslier, D.F. Callen, G.R. Sutherland, and R.I. Richards. 1994. Implications of fra16a structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis. *Science* 264: 1938-1941.
- Pologe, L.G. and J.V. Ravetch. 1988. Large deletions result from breakage and healing of *P. falciparum* chromosomes. *Cell* 55: 869-874.
- Pologe, L.G., B. De, and J.V. Ravetch. 1990. A and t homopolymeric stretches mediate a DNA inversion in *Plasmodium falciparum* which results in loss of gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3243-3246.
- Rouyer, F., M.C. Simmler, C. Johnsson, G. Vergnaud, H.J. Cooke, and J. Weissenbach. 1986. A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex-chromosomes. *Nature* 319: 291-295.
- Scherf, A. and D. Mattei. 1992. Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*—Breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes. *Nucleic Acids Res.* 20: 1491-1496.
- Singer, M.S. and D.E. Gottschling. 1994. TLC1: Template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266: 404-409.
- Smith, K.A., M.B. Stark, P.A. Gorman, and G.R. Stark. 1992. Fusions near telomeres occur very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5427-5431.

- Stark, G.R. 1993. Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv. Cancer Res.* **61**: 87–113.
- Sullivan, K.F. 1992. Centromere protein-b (cenp-b) directly binds to and cross links human centromeric DNA. *Mol. Biol. Cell* **3**: A347.
- Surosky, R.T. and B.K. Tye. 1985. Construction of telocentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 2106–2110.
- Sutherland, G.R. and F. Hecht. 1985. Fragile sites on human chromosomes. Oxford University Press, Oxford.
- Taylor, S.S., Z. Larin, and C. Tyler Smith. 1994. Addition of functional human telomeres to YACs. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 1383–1386.
- Toledo, F., G. Buttin, and M. Debatisse. 1993. The origin of chromosome rearrangements at early stages of ampd2 gene amplification in chinese-hamster cells. *Curr. Biol* **3**: 255–264.
- Toledo, F., D. Leroscouet, G. Buttin, and M. Debatisse. 1992. Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J.* **11**: 2665–2673.
- Tommerup, H., A. Dousmanis, and T. de Lange. 1994. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5777–5785.
- Vollrath, D., R.W. Davis, C. Connelly, and P. Heiter. 1988. Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 6027–6031.
- Wang, S.S. and V.A. Zakian. 1990. Telomere telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* **345**: 456–458.
- Wilkie, A.O.M. and D.R. Higgs. 1992. An unusually large (CA)_n repeat in the region of divergence between subtelomeric alleles of human chromosome 16p. *Genomics* **13**: 81–88.
- Wilkie, A.O.M., J. Lamb, P.C. Harris, R.D. Finney, and D.R. Higgs. 1990. A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (ttaggg)(n). *Nature* **346**: 868–871.
- Wilkie, A.O.M., D.R. Higgs, K.A. Rack, V.J. Buckle, N.K. Spurr, N. Fischel-Ghodsian, I. Ceccherini, W.R. Brown, and P.C. Harris. 1991. Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell* **64**: 595–606.
- Wolfe, J., S.M. Darling, R.P. Erickson, I.W. Craig, V.J. Buckle, P.W.J. Rigby, H.F. Willard, and P.N. Goodfellow. 1985. Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y-chromosome. *J. Mol. Biol.* **182**: 477–485.
- Yoda, K., K. Kitagawa, H. Masumoto, Y. Muro, and T. Okazaki. 1992. A human centromere protein, cenp-b, has a DNA-binding domain containing 4 potential alpha-helices at the nh2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *J. Cell Biol.* **119**: 1413–1427.
- Yu, S., E. Pritchard, E. Kremer, M. Lynch, J. Nancarrow, E. Baker, K. Holman, J.C. Mully, S.T. Warren, D. Schlessinger, G.R. Sutherland, and R.I. Richards. 1991. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* **252**: 1179–1181.
- Zakian, V.A. and H.M. Blanton. 1988. Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2257–2260.
- Zhong, Z., L. Shiue, S. Kaplan, and T. de Lange. 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4834–4843.

第九章 端粒与衰老

Calvin B. Harley

Geron Corporation

Menlo Park, California 94025

30 多年以前, Hayflick 首次提出将体外培养的正常人成纤维细胞的“有限复制力”(limited replicative capacity)作为细胞衰老的表征(Hayflick 1965; Goldstein 1990)。在这一过程中,细胞群中的大部分细胞在经历了一定次数的分裂以后,就不再对各种正常的生长刺激做出反应,而是停止分裂,但它们并没有死亡,仍然保持着代谢活性,只是在基因表达方式上可能有一定的改变(West et al. 1989)。对许多其他类型的体细胞,如上皮细胞、内皮细胞、成肌细胞、星形胶质细胞以及淋巴细胞等,都有证据表明它们的分裂能力受到“体内时钟”的限制(Stanulis Praeger 1987; Harley 1988)。这种时钟以细胞的分裂次数为时间单位,而不是以平时人们所熟悉的那种时间或细胞代谢年龄来衡量(Dell'Orco et al. 1973; Goldstein & Singal 1974; Harley & Goldstein 1978),因此被称为“有丝分裂时钟”。虽然培养基中来自正常年轻人的体细胞的最高的分裂能力因细胞的种类及供体的不同而大不相同,但却都在 50~100 次这个范围之内。作为供体“年龄”的一种衡量尺度,这种分裂能力的降低可能反映了细胞在体内的复制历史。对于其他的脊椎动物,尽管研究得还不够深入,但也证实了其体细胞有限的增生能力以及种属寿命与细胞寿命之间的相关性(Goldstein 1974; Rohme 1981)。这些材料,连同目前公认的假说——衰老的细胞可导致与年龄相关的疾病(Martin 1978; Stanulis Praeger 1987; West et al. 1989; Goldstein 1990; Vaziri et al. 1993; West 1994),一同构成了“Hayflick 现象”,这是一个着眼于分子水平的有趣且重要的生物学问题。我们将在本章中给大家介绍这种假说,即如果端粒的丢失不能作为有丝分裂时钟的一种合理解释,那么至少可以成为有丝分裂时钟的一种标记。

端粒和末端复制问题

像本书其他章节所阐述的那样,端粒是重要的遗传元件,具有稳定线性真核细胞染色体天然末端的作用。然而,线性双螺旋 DNA 末端不能由传统的 DNA 聚合酶复合物完成完全的复制,因为这种聚合酶复合物需要一种不稳定的 RNA 引物来启动 DNA 的合成(见图 9-1a)(Watson 1972)。由于缺少一种克服“末端复制问题”的机制,这将导致生物体不能实现遗传物质完整性的代代相传。因此,所有的种属必须具有至少一个种系机制以阻止其基因组的不完全复制。尽管不同生物体采用了不同的方法来阻止 DNA 的净丢失(Zakian 1989),但大部分真核生物都使用端粒酶来合成端粒 DNA,因而弥补了而不是避

免了 DNA 末端的丢失 (Greider & Blackburn 1985, 1989; Morin 1989; Greider 本书)。

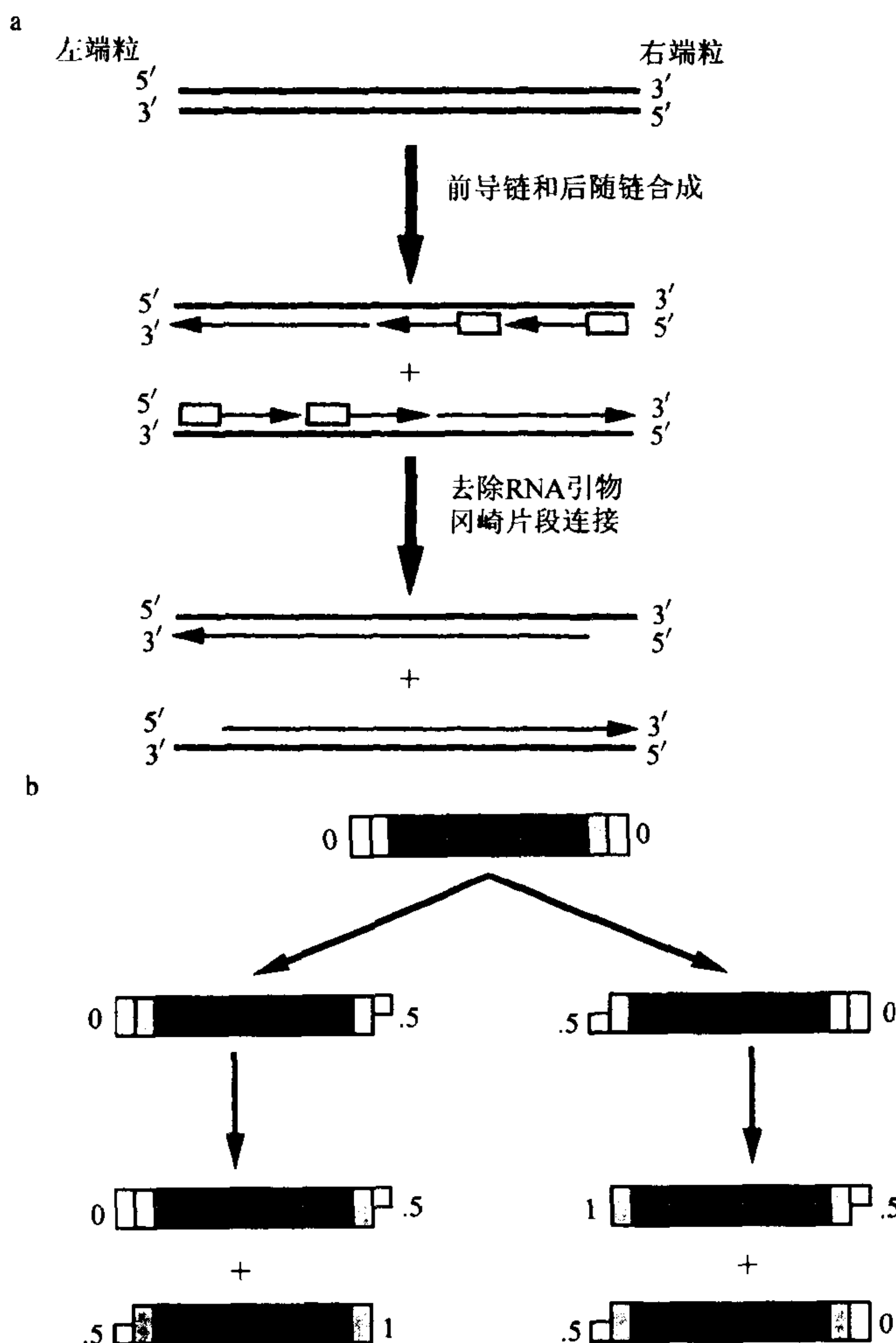


图 9-1 末端复制的问题

a. 表示线性亲代双螺旋的复制(粗线表示),后随链的复制是不连续的,由冈崎片段组成,复制起始有不稳定的 RNA 引物(盒表示)。在 RNA 引物去除,冈崎片段延伸和连接之后,由于 RNA 引物不能被替换,冈崎片段的最 5' 端都是不完整的。如果 5' 端的冈崎片段不能够直接起始对应于模板 DNA 的 3' 端的复制,就会有另外一轮碱基的不完全复制。b. 经过两轮分裂后,单一染色体的 4 个子染色体的预计缺失情况如图所示,数字代表不完全复制的“单位”,指染色体末端到最末端冈崎片段的 5' 端 DNA 的距离。半框表示单链缺失。(引自 Levy et al. 1992。)

如果端粒的长度得不到维持,真核细胞将经历一系列分裂,最后细胞周期停止和(或)细胞死亡,或者成为永生化细胞 (Lundblad & Szostak 1989; Yu et al. 1990; Singer & Gottschling 1994)。目前,末端 DNA 片段不完全复制的观点已经形成模型,并预测发生在每条独立的染色体末端上的缺失过程的某种二项分布是这种不完全复制产生的(见图 9-1b) (Levy et al. 1992)。如果 5' 末端的冈崎片段 RNA 引物不能启动对应模板链的 3' 最末端 DNA 的合成,或者 RNA 引物被水解掉,那么就可以看到有 50% 的端粒将会呈现平头末端,剩下的 50% 则为 3' 悬突。3' 悬突的长度反映出 RNA 引物的长度和(或)模板链 3' 末端距末端冈崎片段复制起点的长度。该模型须进一步证实,因为端粒的功能很有可能需

要一个特殊的 3' 端结构,而且可能内/外切核酸酶对过长或过短的 3' 端悬突进行修饰。此外,通过测定每次细胞分裂时的碱基对数目,人们发现在不存在任何一种外切核酸酶活性的情况下,不完全复制都将导致端粒 DNA 丢失约 1/4 左右的核苷酸 (Levy et al. 1992)。换言之,如果每个子代染色体中新合成链 DNA 的 5' 端丢失 200 个核苷酸,那么在一定孔径的凝胶电泳中测得的端粒缩短速率将为每次细胞分裂缩短 50bp。目前,迫切需要有关端粒酶阳性或阴性细胞中染色体末端微细结构自然发生情况的实验材料,用以证实上述的推测。

端粒长度的测量

迄今为止,在端粒长度的测量方法中,最标准、最可信赖的要数末端限制片段 (terminal restriction fragment, TRF) 的 Southern 分析法 (Allshire et al. 1989; de Lange et al. 1990; Harley et al. 1990; de Lange 本书)。但是,TRF 中含有的 DNA 不是均一的端粒重复序列 (TTAGGG)。举例来讲,TRF 可能既含有简并的 TTAGGG 或非 TTAGGG 序列和 TTAGGG 重复序列,这些序列成区段存在,而不只是在染色体的远端 (见图 9-2)。如今尚不了解这些亚端粒序列是否在正常染色体的结构、功能方面具有重要作用。但有一点是肯定的,即在异常的染色体断裂和通过端粒酶进行愈合的过程中,并不需要亚端粒序列 (Cooke 本书)。TRF 复杂性带来的技术局限性、非 TTAGGG 的 DNA 序列与 TTAGGG 的 DNA 序列在染色体间的变异以及群体中的细胞在体内(外)复制过程中的变化等因素都很难让人们获得细胞衰老与平均 TRF 长度之间的关系。但是,像下文将要提到的那样,对于不同的人体细胞,衰老状态中似乎都存在着相似的 TRF 平均长度。利用原位杂交技术对不同的单个染色体末端 TTAGGG 重复片段长度进行定量分析,为我们进一步了解端粒丢失在细胞衰老过程中作用奠定了基础。



图 9-2 末端限制片段结构 (TRF)

TRF 由 TTAGGG 重复序列 (白格) 和简并的 TTAGGG (阴影部分) 序列以及其他的 DNA 简单序列 (黑格) 组成,这些简单序列相对缺乏限制位点,功能性端粒序列可由最末端的 TTAGGG 块组成。

人类细胞和组织中的端粒长度与端粒酶

TRAP (telomere repeat amplification protocol) 法是近几年才发展起来的测量端粒酶活性的方法。它以 PCR 为基础,具有高灵敏度,因此可以测定体内/外各种细胞或组织中的端粒酶活性 (Kim et al. 1994)。目前已经很清楚地知道,人的大多数正常体细胞中没有明显的端粒酶活性,因此,也就面临着末端复制问题 (见表 9-1)。1994 年, Kim 等人的实验

证实并补充了早期的资料,他们发现人类成纤维细胞、胚胎肾细胞(培养的)、淋巴细胞以及上皮细胞中的端粒酶活性受到很大抑制(Counter et al. 1992,1994a,1994b;Vaziri et al. 1993;Shay et al. 1993a,1993b)。而且据估计,培养的细胞中端粒酶活性被抑制的程度超过 1000 倍(Kim et al. 1994)。同样的实验还证明端粒酶的确存在于雌/雄生殖组织、大量不同的肿瘤细胞系及肿瘤组织中,这些细胞群至少是一个亚细胞系,表现出与永生化特点明显的一致。许多长寿种属,如人类,很有可能是通过大多数体细胞的高水平端粒酶抑制作用降低癌症的发生率(Harley et al. 1994)。

表 9-1 在人细胞和组织中的细胞永生化和端粒酶活性

来源	表现型	组织来源	端粒动力学	端粒酶活性	参考文献
培养 细胞	非永生化(分裂)	皮肤、肺、血管、造血系统、卵巢	变短或 n. t. ^d	0/25+ ^e	1~5
	非永生化(不分裂)	结缔组织(肺、皮肤)	稳定	0/3+	7
	非永生化(寿命延长)	肾胚	变短	0/5+	5,8
		结缔组织	变短		
		血液	变短		
正常 组织	永生化(转化系 ^a)	肺、肾、前列腺、视网膜	稳定或 n. t.	8/10+	5,8~10
	永生化(肿瘤系)	14 种不同的组织	稳定或 n. t.	0/70+	5,6,9
	永生化 ^b	睾丸	稳定	2/2+	1,9
		结缔组织	变短		1,2,9
		表皮	变短		11,12
		血液	变短		3,6,8,13
	非永生化 ^c	血管内膜	变短	0/>60+	9
		大脑	稳定		7,9
		其他(乳腺、前列腺、子宫、肠、 肾、肝、肺、肌肉、脾)	n. t.		9
		乳腺	n. t.		9
肿瘤 组织		原发,无淋巴结转移		1/4+	
		导管型,有淋巴结转移		14/15+	
		卵巢癌	稳定	7/7+	6
		前列腺	n. t.		9
		BPH		1/10+	
		PIN3		3/5+	
		腺癌		2/2+	9
		神经母细胞瘤	变短	5/5+	9
		头颈部	n. t.	14/16+	
		结肠			9,13
		息肉	n. t.	0/1+	
		小导管状腺瘤	变短或 n. t.	0/1+	
		上皮癌	变短或 n. t.	8/8+	

续表

来源	表现型	组织来源	端粒动力学	端粒酶活性	参考文献
		子宫	n. t.		9
		子宫肌瘤		0/11+	
		肉瘤		3/3+	

(引自 Harley et al. 1994)参考文献:(1)Allsopp et al. 1992;(2)Harley et al. 1990;(3)Vaziri et al. 1993;(4)Harley et al. 1992;(5)Counter et al. 1992;(6)Counter et al. 1994b;(7)Allsopp et al. 待发表;(8)Counter et al. 1994a;(9)Kim et al. 1994;(10)Shay et al. 1993b;(11)K. R. Prowse & C. B. Harley 未发表;(12)Lindsey et al. 1991;(13)Hastie et al. 1990.

^a T 抗原转化的亚系和永生化的细胞,可能通过遗传不稳定性,端粒酶呈阴性;尚不清楚这些亚克隆是否具有无限的复制能力(Kim et al. 1994)

^b 生殖细胞系是永生化的,但个别例外。

^c 本研究没有说明正常细胞中是否具有罕见的永生化的干细胞。

^d n. t. 未检测

^e 用 PCR 检测一些培养的造血细胞,可发现它们具有微弱的端粒酶活性。

(Kim et al. 1994; C. -P. chiu et al. 未发表)

细胞衰老及永生化的端粒假说

有关细胞衰老及永生化的端粒假说(Olovnikov 1973; Harley et al. 1990; Harley 1991)可通过图 9-3 加以说明。支持此种模型的实验数据包括:①在雌、雄生殖组织中,极易检测到端粒酶的活性,而且在性细胞中可稳定维持较长的端粒;②对于检测的大多数出生后的躯体组织和细胞而言,无论在体内还是体外,均很难检测到端粒酶的活性,而且随着年龄的增长端粒逐渐缩短;③在转化有病毒癌蛋白的前危机期体细胞群内,未检测到端

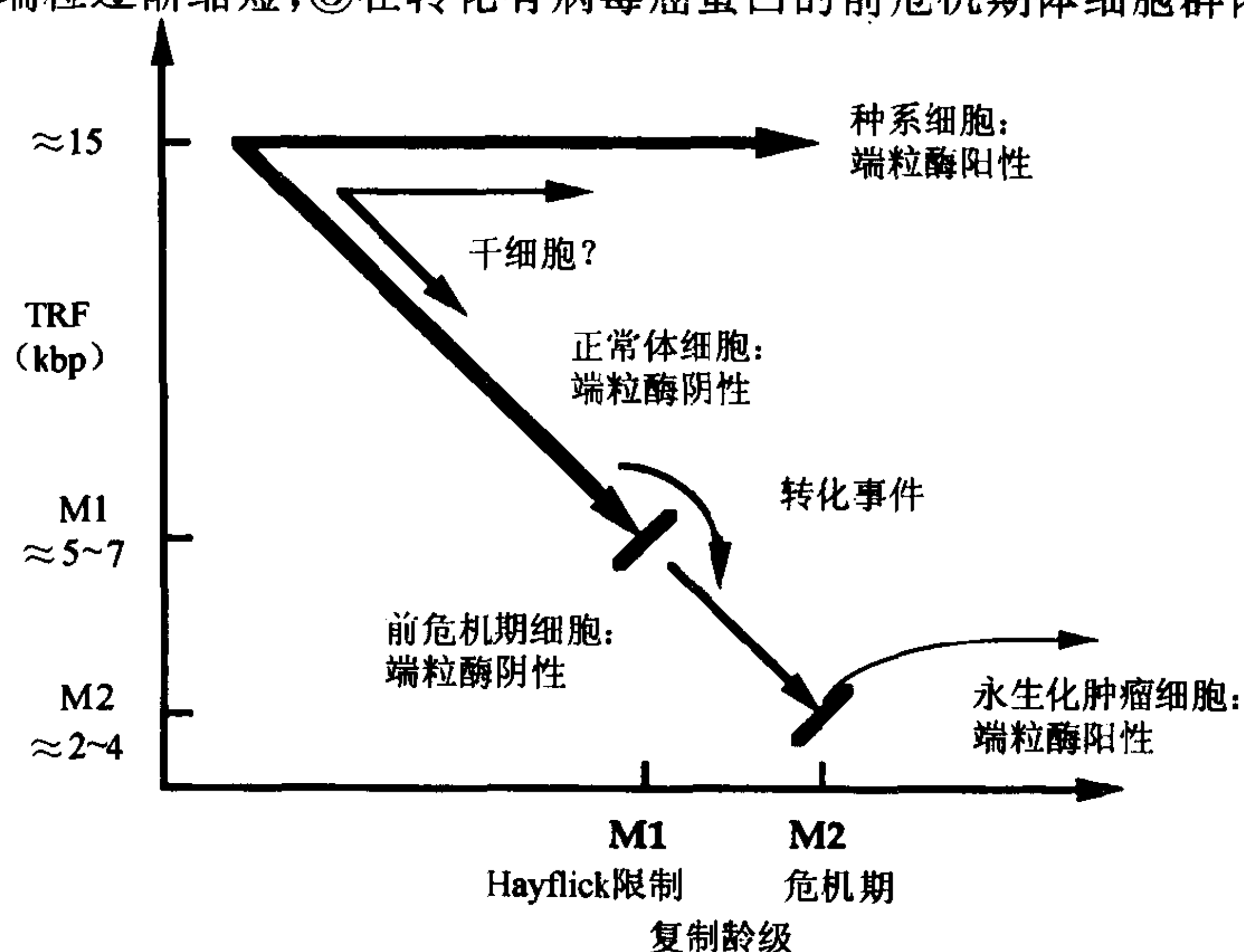


图 9-3 细胞衰老和永生化的端粒假说

在生殖细胞中,端粒酶具有活性以维持长而稳定的端粒。在大多数正常的体细胞中,端粒酶活性被抑制,导致细胞分裂时端粒丢失。在 M1 期(Hayflick 限制),人们推测在一条或多条染色体上严重的端粒丢失是不可逆的细胞周期阻滞的信号。对于干细胞中的端粒酶活性和端粒长度我们还一无所知。转化使体细胞绕过 M1 期而不激活端粒酶,当大量染色体的端粒长度变得非常短的时候,细胞进入危机期(M2),极少数带有端粒酶激活的细胞克隆渡过 M2 期,可以稳定染色体并获得无限的生长能力。(引自 Harley 1991, Harley et al. 1994。)

粒酶活性,而且端粒也持续缩短;④在后危机期(即细胞获得永生化后)转化的细胞以及在肿瘤细胞系中都可以检测到端粒酶的活性,而且端粒长度保持稳定(通常是维持较短的长度)。除了上述这些现象之外,该模型也反映出一些其他问题。一方面,它将端粒的丢失同衰老联系起来;另一方面,它则将端粒酶再激活同癌症联系起来。为确定端粒的丢失是否仅仅是复制衰老的一种生物标记,或是原因之一,我们期待建立一种实验模式以验证操纵端粒长度是否可以影响到细胞的寿命。同样,我们也急切盼望那些抑制或激活端粒酶的实验结果,以判断这个关键的 DNA 合成酶是否是人类细胞获得永生化的必需和(或)关键性的环节(de Lange 本书)。

许多证据都表明,对于衰老的人类细胞,端粒的丢失具有重要的生物学意义:①在多种类型的衰老体细胞中,都呈现出共同的平均端粒长度(Harley et al. 1990;Vaziri et al. 1993;E.Chang et al. 未发表);②与端粒丢失有关的染色体畸变,在体外衰老细胞中及体内的淋巴细胞中聚积(Harley 1991);③通过对 TRF 中端粒 DNA 数量的估计可以看出,衰老细胞中的一些端粒丢失了大部分(如果不是全部的话)末端端粒重复序列(Levy et al. 1992;Harley et al. 1994)。此外,当纤毛虫和酵母体内的端粒维持功能受到破坏时,细胞将会出现衰老现象,而且当端粒缩短至其关键长度后,衰老现象表现得更为明显(Lundblad & Szostak 1989;Yu et al. 1990;Lundblad & Blackburn 1993;Singer & Gottschling 1994)。

上述资料表明,我们应该确定在端粒丢失和人类细胞衰老上是否真的存在着因果关系(Goldstein 1990;Harley et al. 1990;Wright & Shay 1991)。在人们提出的众多理论中,有一个特别引人注意,它认为 Hayflick 限制,或死亡 I 期(M1)仅仅是永久性的细胞周期终止。这是由于“关卡机制”识别出了位于一个或多个染色体末端上的“损伤”DNA。这种机制需要 p53 和 pRB 的参与,至少在一些细胞中是这样的。因为病毒癌蛋白或反义寡核苷酸能够降低 p53 和 pRB 的水平,使细胞绕过 M1 期(Hara et al. 1991;Shay et al. 1991,1993a;Bond et al. 1994)。尽管 pRB 像预想的那样在未分裂的衰老细胞中呈现低磷酸化(Stein et al. 1990),但衰老细胞 p53 蛋白及其 mRNA 水平却无明显变化(Afshari et al. 1993)。而且,迄今为止尚未有人对衰老细胞中的 p53 活性进行过仔细的研究。

干细胞是否随年龄增长而丢失端粒 DNA

端粒的丢失可以用来衡量培养基中再生细胞的衰老程度,而且在体内可根据它来判断细胞供体的年龄,这种功能已在人类多种细胞或可再生的组织中得到了证实。如结缔组织中的成纤维细胞(Harley et al. 1990;Allsopp et al. 1992;Levy et al. 1992)、肠黏膜上皮(Hastie et al. 1990)、皮肤表皮细胞(角质化细胞)(Lindsey et al. 1991)、外周血淋巴细胞(Hastie et al. 1990;Vaziri et al. 1993;Slagboom et al. 1994)以及候选的造血干细胞(Vaziri et al. 1990)。总的看来,对于处在复制状态的体细胞而言,其端粒 DNA 丢失的速度在体外平均为 30~200bp/次细胞群分裂,在体内约为 10~50bp/年。如果躯体干细胞也缺乏端粒酶,那么,这个丢失速度暗示着再生组织的干细胞层每年分裂次数平均小于一次。另外,已经有人用 TRAP PCR 法在一些骨髓或造血干细胞制备物以及外周血液淋巴细胞中检测到了微弱的端粒酶活性(Counter et al. 1995;C.-P. Chiu et al. 未发表)。已知造血干细胞及外周血淋巴细胞在体内/外均随年龄增长而丢失端粒 DNA,那么检测出的

酶活性具有何种生物学意义则让人不甚明了(Vaziri et al. 1993,1994)。可能所检测出的这种酶活性只是一种残留的活性,只能用来减缓端粒丢失的速度而不是无限地延长这些细胞的寿命,这种残留的活性只能用更敏感的方法检测到。这种低水平的酶活性也可能来自细胞群体中的一小部分或正在减少的一部分细胞,这些细胞实际上具有全部的酶活性以及完整的自我再生能力。但这种假说似乎缺乏说服力,因为它还需要一个假说来解释为什么这种细胞在组织中不能维持住端粒长度,只能用作确定细胞供体的年龄。

有人可能会问,如果干细胞拥有“有丝分裂时钟”以及在 100 代之后确实会进入复制衰老状态,那么如何解释高度增生的组织(如造血系统和胃肠上皮)中细胞的快速更新呢?令人遗憾的是,对这个问题的解释在很大程度上是推测的。关于定向祖先细胞在终末分化之前所能进行的分裂次数,干细胞“顺序补充”(sequential recruitment)进入增殖状态的时间、程度以及起源等问题都不清楚。目前已清楚的是,根据相对随意假说,干细胞每年大约分裂一次,而定向子细胞则相对地进行 30 次的快速指数分裂。这样,对于整个人一生而言,造血系统能够产生足够量的组织来满足细胞更新(见图 9-4)(Moore 1995)。这个模型的前提是假设最初的干细胞必须具备能维持 90 次分裂的足够量的端粒 DNA。因此,每个

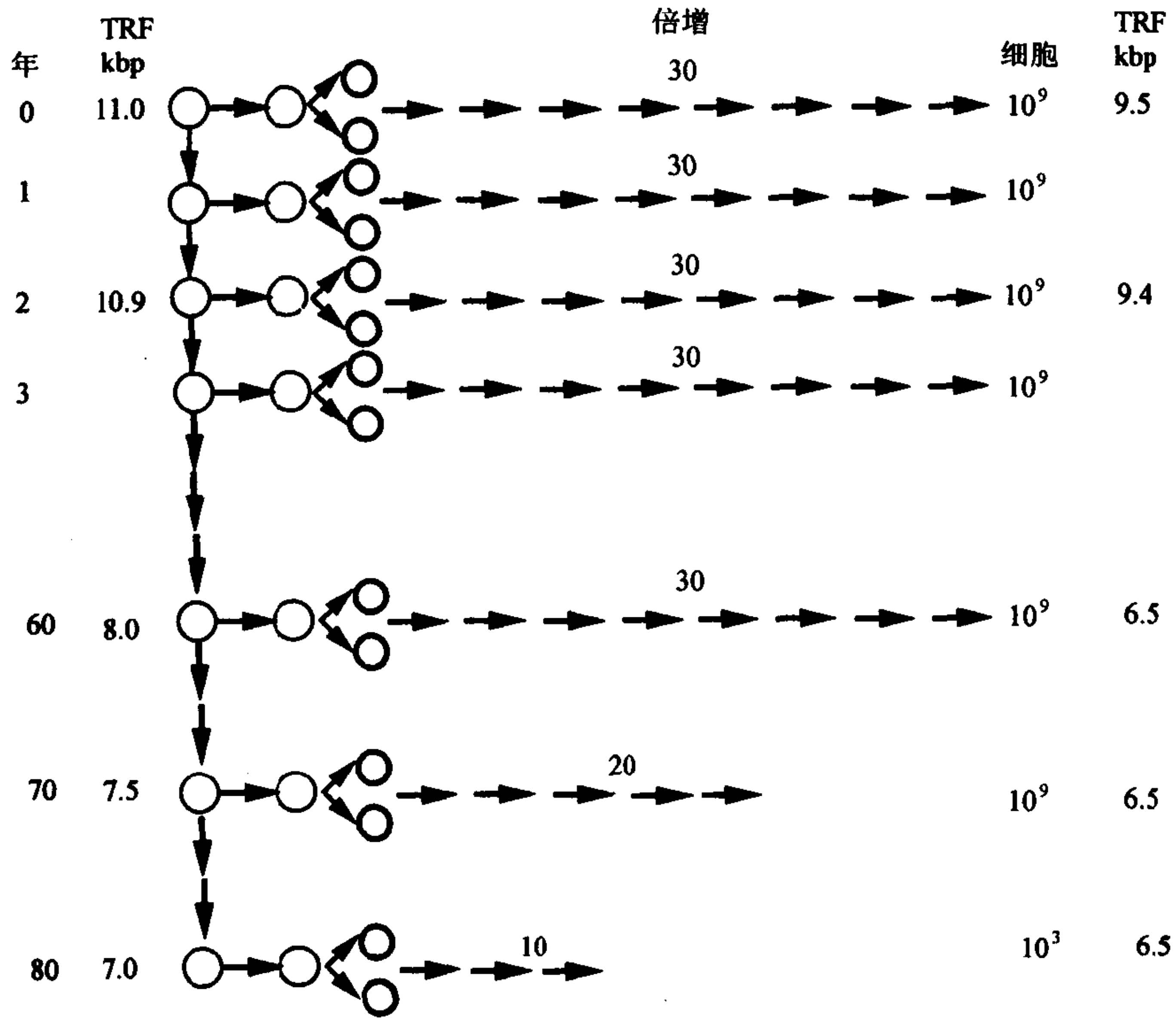


图 9-4 非永生干细胞增殖模型

在这个模型中,在时间 0 处的原代干细胞(顶端左侧)的 TRF 的长度为 11kbp,并且无端粒酶活性。推测细胞衰老发生在细胞分裂 90 次以后,此时端粒长度 6.5kbp(假设端粒每分裂一次丢失 50bp)。分裂的结果产生一些新的干细胞(竖箭头所指)和定向胚细胞以及一些祖先细胞(横箭头所指)。这些细胞经 30 次分裂后,以指数增长到 10^9 个,并且比原来的亲本干细胞的端粒短 1.5kbp。这些子代干细胞的 G_0 期大约 1 年,当它们进入增殖期,它们有相似的非同步分裂。20 世纪 60 年后,这些克隆开始衰老,大约持续 30 年。在此模型中,在端粒丢失速率方面,干细胞和定向细胞无区别。在其他的模型中,人们猜想到端粒酶在一些特异的细胞亚群中进行连续的和短暂的表达。

干细胞每年分裂一次,其中的一个子细胞经过 30 次克隆分裂而增多起来,也就是说每个干细胞每年可产生大约 $2^{30}=10^9$ (近 1g)左右的分化细胞。这些多分支干细胞克隆的老化现象最先发生在大约 60 年以后:这 60 个干细胞每年分裂一次,再加上定向细胞进行的 30 次细胞快速分裂,耗尽了细胞的最大复制力。由于一个成年人体内的造血干细胞可能会超过 10^7 个,那么所有的干细胞每年分裂一次,就会产生多于 10 000kg 以上的血细胞。很明显,这将造成细胞的大量过剩。因此该假说认为,不同的干细胞在许多年里只有一段时间才“顺序补充”到增生的群体中去。这样,每年产生的组织量才会相应地减少,而且骨髓的复制寿命也会大大超过 60~90 年(见图 9-5)。这种不同步的克隆衰老形式可能发生在体内,这可以说明这段时间内造血干细胞群及外周血中观察到的端粒逐渐丢失情况(Vaziri et al. 1993,1994)。创伤或感染将会加速某些干细胞群的细胞更新,继而导致普遍的或特异的未成熟造血系统或免疫系统老化现象的出现。

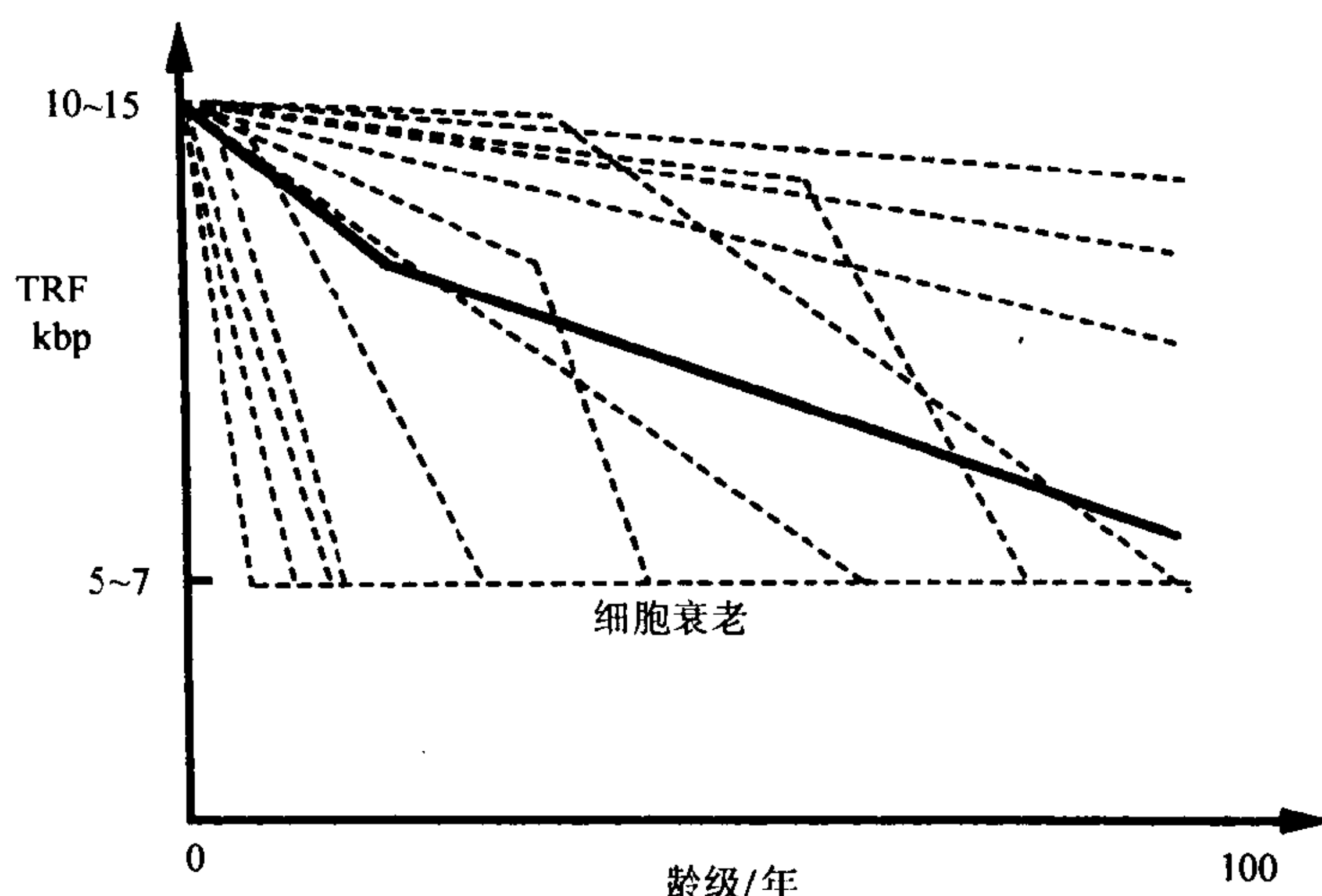


图 9-5 干细胞子代克隆衰老的异质性

不同的干细胞在个体寿命中可能以不同的、非均一的速率进入增殖期。虚线表示随机选择的不同干细胞子代 TRF 的长度变化。推测定型子细胞指数增加相对快些(见图 9-4),这些线的斜率表示干细胞子代(自我更新细胞)进入增殖期的速度。甚至在同一家系中,斜率并不是永恒不变的。实线表示整个细胞群中端粒的平均长度。本图不是按数量的比例关系来绘制的。

上述模型的前提是假设干细胞系中的端粒酶在任何阶段都发挥作用。但是,并没有足够的实验来充分说明这一点。因此,端粒酶很有可能在一小群干细胞或早期出现的定向祖先细胞中发挥作用,而且,这种酶的活性也有可能使组织有限的复制寿命延长。由于囊泡上皮干细胞在经过不到 10 次的细胞分裂定型之后便趋向于分化,而且这种组织的更新速度可能是以天来计算的,因此,很难想像如果没有这些端粒酶活性,这些组织怎样在没有更多干细胞(来自比囊泡更大的腔隙)的增援下存活一生。此外,单细胞测试或分子/抗体探针法对端粒酶的原位测定都有助于这一问题的解决。

早衰症中的端粒

对患有郝-吉二氏病(Hutchinson-Gilford progeria, 一种明显的早衰综合征)(Mills & Weiss 1990)儿童的成纤维细胞进行体外培养后发现,其端粒长度与同龄正常细胞相比明显变短,这与细胞的复制力降低相一致(Allsopp et al. 1992)。目前尚未发现来自早患者的成纤维细胞在细胞分裂时具有较快的端粒丢失速度,因此有必要进一步研究以验证这些个体究竟是在出生时就具有较短的端粒还是具有快速的体内细胞更新速度。

另一种遗传性疾病——21 三体性综合征[唐氏综合征(Down's syndrome)],已被认定为早老样综合征(Martin 1978)。由于一些唐氏综合征患者的发病与免疫系统老化有关(Franceschi et al. 1991),所以,引人注意的是,唐氏综合征患者外周血淋巴细胞中可判断出供体年龄的端粒丢失程度是同龄正常人的三倍之多(Vaziri et al. 1993)。同郝-吉二氏病患者不同的是,唐氏综合征患者在出生或接近出生时的最初端粒长度同正常同龄人无显著差异。然而,是否在每次细胞分裂时端粒的丢失速度均不同,21 三体性综合征是否促进了体内淋巴细胞的再生等,这些问题都还不清楚。因此,对上述病症以及其他加速衰老的遗传病例(如 Werner's 综合征)的深入研究,也许会进一步说明端粒丢失以及细胞的衰老在与年龄相关的疾病中的作用。

比较学研究

有人报道,小鼠体内端粒丢失程度不能作为衡量年龄的依据。由于在大多数的实验株小鼠和其他的啮齿类动物的染色体末端附近及染色体内部位点都广泛存在着 TTAGGG 重复序列,因此很难评估这些报道的意义(Kipling & Cooke 1990; Starling et al. 1990)。很有可能是由于端粒 DNA 丢失作为衡量复制衰老程度的生物学意义已被非端粒的 TTAGGG 分布所掩盖,也有可能是由于小鼠体内确实没有发生过明显的端粒丢失,而且对于啮齿类而言,细胞的复制衰老在个体老化中并不具有重要意义。因此,与长寿的人类相比,细胞老化的相对重要性在寿命较短的啮齿动物身上明显不同。在啮齿类动物正常的组织中已经检测到端粒酶,而且体外培养的啮齿类细胞具有高频自发性永生现象(Prowse & Greider 1995),这验证了啮齿类细胞的致死性表型的微弱表达。这些发现有助于我们解释为什么与人类相比,小鼠每个细胞和每年的癌发生率均极高(Miller 1991; Prowse & Greider 1995)。

对一些真核微生物的研究表明,端粒长度的维持与细胞增生之间存在着预期的相关性。研究发现,在四膜虫(Yu et al. 1990)与酵母(Singer & Gottschling 1994)端粒酶中的 RNA 组分上或酵母 *Est1* 基因上(Lundblad & Szostak 1989; Lundblad & Blackburn 1993)突变所造成的渐进性端粒丢失都可造成克隆的老化,或者说至少可以造成克隆中大部分细胞的老化。同样,单个端粒的工程性缺失将导致 DNA 修复所依赖的关卡受到抑制(Sandell & Zakian 1993)。目前需要进一步了解这些生物对关键性端粒丢失会产生何种的细胞应答,以便进一步确定它们是否能提供人类细胞衰老或危机的模型。很明显,草履虫的有限克隆寿命与关键端粒的丢失之间并无联系(Gilley & Blackburn 1994)。但许多与

端粒丢失无关的因素也可用来解释不同种属或不同环境下细胞寿命的有限性。同样道理,生物衰老的许多方面可能与细胞复制衰老的机制无关。而且,同复制衰老相比,这些机制的相对重要性在种属间具有很大的差异。在用比较生物学全面解决衰老和永生化与端粒关系假说之前,我们需要在更广泛的生物物种范围内,用更新、更好的方法测定端粒的长度以及体内端粒酶的功能活性。

结束语

总之,人类体细胞在复制衰老过程中产生的端粒丢失现象已在体外得到了证实,而且体内的端粒丢失可作为判断供体年龄的依据。尽管不能排除其他因素,但丢失现象的产生很可能是因为在缺少端粒酶的情况下线性染色体 3' 端无法完成完全复制。人类细胞中染色体末端的精细结构日前尚未确定,但现有的资料表明,发生在一个或多个染色体中关键性的端粒丢失将会成为细胞周期停止在衰老状态的启动信号。作者本人较倾向于这样一个模型,即端粒功能性丧失引起损伤的 DNA 反应途径,该途径类似于已知的关卡机制。那些缺少端粒酶或其他机制来修复端粒丢失的细胞,必将进入不可逆转的停止状态。对体外培养细胞及体内肿瘤细胞和组织的研究表明,端粒酶异常的再活化将最终导致细胞永生化。这些发现给我们提供了一个基本框架,以便进行新型药物的发现与开发,从而治疗与年龄相关的疾病,甚至包括癌症。

致谢

谨以此文献给已于 1994 年 7 月 4 日去世的 Sam Goldstein。同时感谢所有为本文提供资料及思路的同事和合作者。他们的名字在本文的部分参考文献中均已提到。本研究得到了国家衰老研究所、生物医学衰老研究联合信号基金(Allied Signal Award)、加拿大癌症协会、加拿大医学研究委员会和 Geron 公司的资助,在此一并致谢。

参考文献

- Afshari, C.A., P.J. Vojta, L.A. Annab, P.A. Futreal, T.B. Willard, and J.C. Barrett. 1993. Investigation of the role of G1S cell cycle mediators in cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 209: 231-237.
- Allshire, R.C., M. Dempster, and N.D. Hastie. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeats distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17: 4611-4627.
- AHsopp, R.C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E.V. Younglai, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10114-10118.
- Bond, J.A., F.S. Wyllie, and D. Wynford-Thomas. 1994. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* 9: 1885-1889.
- Counter, C.M., H.W. Hirte, S. Bacchetti, and C.B. Harley. 1994a. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2900-2904.
- Counter, C.M., F.M. Botelho, P. Wang, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1994b. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* 68: 3410-3414.

- Counter, C.M., J. Gupta, C.B. Harley, B. Leber, and S. Bacchetti. 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315-2320.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921-1929.
- de Lange, T., L. Shiue, R.M. Myers, D.R. Cox, S.L. Naylor, A.M. Killery, and H.E. Varmus. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10: 518-527.
- Dell'Orco, R.T., J.G. Mertens, and P.F. Kruse, Jr. 1973. Doubling potential, calendar time, and senescence of human diploid cells in culture. *Exp. Cell Res.* 77: 356-360.
- Franceschi, C., D. Monti, A. Cossarizza, F. Fagnoni, G. Passeri, and P. Sansoni. 1991. Aging, longevity, and cancer: Studies in Down's syndrome and centenarians. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 621: 428-440.
- Gilley, D. and E.H. Blackburn. 1994. Lack of telomere shortening during senescence in *Paramecium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1955-1958.
- Goldstein, S. 1974. Aging in vitro: Growth of cultured cells from the Galapagos tortoise. *Exp. Cell Res.* 89: 297-302.
- . 1990. Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. *Science* 249: 1129-1133.
- Goldstein, S. and D.P. Singal. 1974. Senescence of cultured human fibroblasts: Mitotic versus metabolic time. *Exp. Cell Res.* 88: 359-364.
- Greider, C.W. and E. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413.
- . 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337.
- Hara, E., H. Tsurai, A. Shinozaki, S. Nakada, and K. Oda. 1991. Cooperative effect of antisense-RB and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 528-534.
- Harley, C.B. 1988. Biology and evolution of aging: Implications for basic gerontological health research. *Can. J. Aging* 7: 100-113.
- . 1991. Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 256: 271-282.
- Harley, C.B. and S. Goldstein. 1978. Cultured human fibroblasts: Distribution of cell generations and a critical limit. *J. Cell. Physiol.* 97: 509-515.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
- Harley, C.B., H. Viziri, C. Counter, and R.C. Allsopp. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27: 375-382.
- Harley, C.B., N.W. Kim, K.R. Prowse, S.L. Weinrich, K.S. Hirsch, M.D. West, S. Bacchetti, H.W. Hirte, C.M. Counter, C.W. Greider, W.E. Wright, and J.W. Shay. 1994. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59: 307-315.
- Hastie, N.D., M. Dempster, M.G. Dunlop, A.M. Thompson, D.K. Green, and R.C. Allshire. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346: 866-868.
- Hayflick, L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37: 614-636.
- Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L.C. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2014.
- Kipling, D. and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 346: 400-402.
- Levy, M.Z., R.C. Allsopp, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.H. Harley. 1992. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225: 951-960.

- Lindsey, J., N. McGill, L. Lindsey, D. Green, and H. Cooke. 1991. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat. Res.* **256**: 45–48.
- Lundblad, V. and E.H. Blackburn. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est-senescence. *Cell* **73**: 347–360.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633–643.
- Martin, G.M. 1978. Genetic syndromes in man with potential relevance to the pathobiology of aging. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **14**: 5–39.
- Miller, R.A. 1991. Gerontology as oncology: Research on aging as the key to understanding cancer. *Cancer* **68**: 2496–2501.
- Mills, R.G. and A.S. Weiss. 1990. Does progeria provide the best model of accelerated ageing in humans? *Gerontology* **36**: 84–98.
- Moore, M.A.S. 1995. Hematopoietic reconstruction: New approaches. *Clin. Cancer Res.* **1**: 3–9.
- Morin, G.B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**: 521–529.
- Olovnikov, A. 1973. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**: 181–190.
- Prowse, K.R. and C.W. Greider. 1995. Developmental and tissue specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: (in press).
- Rohme, D. 1981. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 5009–5013.
- Sandell, L.L. and V.A. Zakian. 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729–739.
- Shay, J.W., O.M. Pereira-Smith, and W.E. Wright. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* **196**: 33–39.
- Shay, J.W., W.E. Wright, and H. Werbin. 1993a. Loss of telomeric DNA during aging may predispose cells to cancer. *Int. J. Oncol.* **3**: 559–563.
- Shay, J.W., W.E. Wright, D. Brasiskyte, and B.A. Van der Haegen. 1993b. E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* **8**: 1407–1413.
- Singer, M.S. and D.E. Gottschling. 1994. TLC1: Template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404–409.
- Slagboom, P.E., S. Droog, and D.I. Boomsma. 1994. Genetic determination of telomere size in humans: A twin study of three age groups. *Am. J. Hum. Genet.* **55**: 876–882.
- Stanulis Praeger, B.M. 1987. Cellular senescence revisited: A review. *Mech. Ageing Dev.* **38**: 1–48.
- Starling, J.A., J. Maule, N.D. Hastie, and R.C. Allshire. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6881–6888.
- Stein, G.H., M. Beeson, and L. Gordon. 1990. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* **249**: 666–668.
- Vaziri, H., W. Dragowska, R.C. Allsopp, T.E. Thomas, C.B. Harley, and P.M. Lansdorp. 1994. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 9857–9860.
- Vaziri, H., F. Schachter, I. Uchida, L. Wei, X. Zhu, R. Effros, D. Cohen, and C.B. Harley. 1993. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 661–667.
- Watson, J. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**: 197–201.
- West, M.D. 1994. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch. Dermatol.* **130**: 87–95.
- West, M.D., O.M. Pereira Smith, and J.R. Smith. 1989. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase

- activity. *Exp. Cell Res.* **184**: 138–147.
- Wright, W.E. and J.W. Shay. 1991. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet.* **8**: 193–197.
- Yu, G.-L., J.D. Bradley, L.D. Attardi, and E.H. Blackburn. 1990. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated telomerase RNAs. *Nature* **344**: 126–132.
- Zakian, V.A. 1989. Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 579–604.

第十章 人类癌症的端粒动力学和基因组的不稳定性

Titia de Lange

The Rockefeller University

New York, New York 10021

端粒丢失和肿瘤基因组的获得性不稳定性

80 多年以前,Boveri(1914)提出,在人类体细胞的分裂过程中,染色体不分离现象会导致细胞的恶性转化。从那时起,人们逐渐积累了有关癌细胞染色体的异常行为的资料。例如,流行病学家统计出人类的一些恶性肿瘤是 5、6 个独立的基因突变共同作用的结果。由于人类正常细胞中的基因突变率很低,难以计算所有这些变化,因此认为癌细胞已经获得了破坏 DNA 的能力(Nowell 1976)。这里所引用的一些资料表明,突变表型产生的部分原因是肿瘤形成过程中染色体端粒的缺失。

肿瘤基因组的不稳定性在很大程度上是由于细胞周期调控失常和细胞周期关卡机制丧失(Hartwell & Kastan 1994)。例如,如果将肿瘤抑制基因 $p53$ 看作是检查 DNA 损伤和纺锤体形成时所用关卡的一部分,那就不难理解为什么 $p53^-$ 肿瘤能耐受基因型的变化(Hartwell & Kastan 1994;Cross et al. 1995)。但导致这些细胞 DNA 损伤的根源是什么呢?首先,一些突变可能是基因组正常维持过程中的内在错误,例如, $p53^{-/-}$ 小鼠正常细胞中基因组的不稳定性升高(Livingstone et al. 1995;Cross et al. 1995)。其次,环境危害也可能是导致染色体病变的一个因素。

第三,人类肿瘤中基因型的改变还可能表现(修复)基因的功能障碍,这种基因在正常情况下维持着基因组的完整性。这在遗传性结肠癌的非息肉型中尤其如此。结肠癌细胞中的染色体由于不具有任何一种修复功能而形成伤痕(Fishel et al. 1993;Leach et al. 1993;Bronner et al. 1994;Papadopoulos et al. 1994)。同样,着色性干皮病、范康尼氏贫血、布卢姆氏综合征和运动失调性毛细血管扩张症家族中出现的高肿瘤发生率可能都是由于修复基因的突变产生的突变子表型造成的。

本综述着重介绍导致癌症染色体不稳定的另一个因素——癌症染色体的端粒状态。在人类体细胞中,端粒的程序性缩短以及由此产生的端粒功能丧失可部分解释肿瘤遗传的不稳定性。本章将讨论人类肿瘤中端粒的结构及其动力学,端粒缩短在杂合性丧失和基因扩增中的作用,以及端粒酶对肿瘤发生的影响。

人类染色体末端的端粒复合体

端粒的 DNA 序列

与所有脊椎动物的染色体末端一样,人的端粒也含有串联的 TTAGGG 重复序列。它

们按特定的方向排列,使富含 G+T 的 DNA 链朝每条染色体的 3'末端延伸(Moyzis et al. 1988;Brown 1989;Cheng et al. 1989;Cross et al. 1989;Meyne et al. 1989;de Lange et al. 1990)。目前还不清楚 DNA 最末端的结构,但从单细胞生物的端粒复制机理和端粒末端结构可以预知它是一个 3'端的悬突(Henderson 本书)。确定人类染色体末端是否真的带着这样的 3'尾巴,以及它们在端粒功能中的作用具有十分重要的意义。

尽管还不能确定人类端粒的全序列,但很明显,大多数末端重复序列是由均一的 T_2AG_3 重复组成的。在短端粒克隆上测得的一个共 6kb 的序列中,并未发现一处与 T_2AG_3 基序不同(de Lange et al. 1990),这表明 $(T_2AG_3)_n$ 是主要的端粒序列。相反,在许多(甚至可能是全部的)人类端粒的基部,由 T_2AG_3 相关重复序列组成的一个混合成分掺入到第一个 1kb 的序列中(见图 10-1)(Allshire et al. 1989;Brown et al. 1990;Cross et al. 1990)。染色体内部, T_2AG_3 基序完全消失,邻近端粒的 DNA 主要由更长、更不均一的亚端粒重复序列构成(Henderson 本书)。

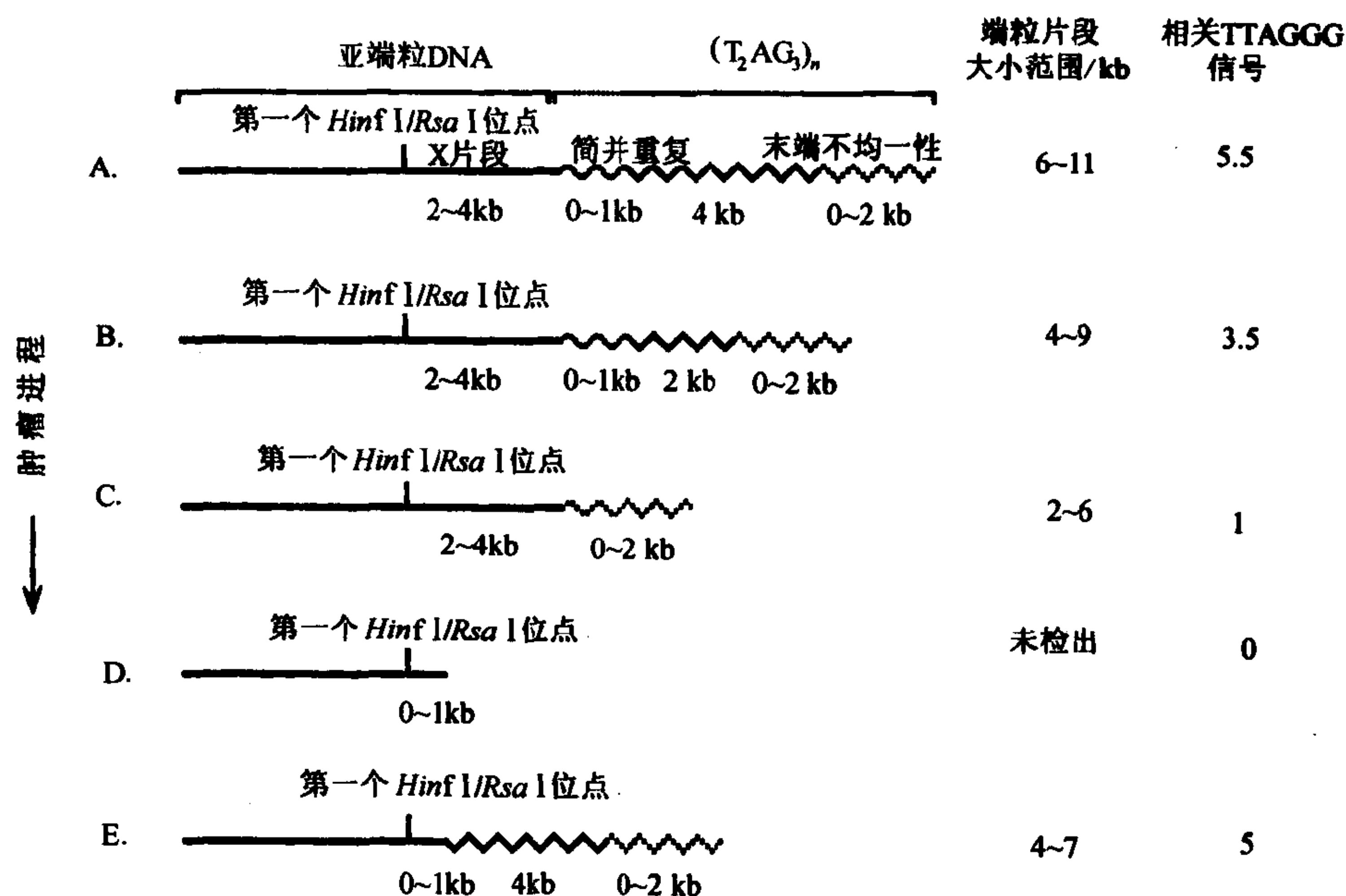


图 10-1 人类染色体末端结构示意图及肿瘤端粒结构的可能变化

A. 正常细胞和肿瘤发生早期肿瘤细胞中人类染色体末端的结构。图中显示了两段。最末端的片段 $(T_2AG_3)_n$ 由几个 kb 的 T_2AG_3 重复序列和端粒基部约 1kb 的简并重复序列构成。每个区域都可以与 T_2AG_3 重复序列探针杂交。如图所示,端粒的末端表现出相当大的长度差异。图中的第二个片段代表不与 T_2AG_3 重复序列杂交的亚端粒 DNA。X 片段表示决定末端限制片段(如 *Hinf*I/*Rsa*I 片段)长度的亚端粒 DNA。右栏列出了理论的长度值和末端限制片段的杂交信号。(B~D) 端粒损失(decay)不同阶段染色体的末端。(E) 端粒酶修补后的染色体末端的假想结构。注意,E 中染色体末端失去了部分 X 片段。因此,染色体末端显示出与它们的长度不相符的过高的 T_2AG_3 重复序列信号(与 B 相比)。详细讨论见正文。

端粒长度的测定

对于端粒动力学,确定 T_2AG_3 重复序列排列的长度是很重要的。可用两种方法判断端粒的长度。一个方法与确定酵母端粒长度(Zakian 本书)的标准程序类似,使用大约 10

个一组的人类染色体末端进行测量。这些末端均携带相同的亚端粒重复片段,并因此具有相同的物理图谱(de Lange et al. 1990)。通过对克隆 DNA 进行序列分析,得知端粒序列的位置,利用这个信息,可以在基因组的 DNA 印迹中相当准确地测量端粒的长度。因为没有理由认为这部分端粒与细胞中其他染色体末端的性质有所不同,因此这个结果适用于所有端粒。这个方法的有效性可通过从大约包含 4kb 端粒重复序列上(利用 BAL 31 外切核酸酶)切除 2kb 的长度来证明。与预期结果相同,随着端粒的变小, T_2AG_3 重复信号减少 50%(Saltman et al. 1993)。

测定端粒长度的另一个方法是用高频切点的限制性内切核酸酶,如 *Hinf* I 和 *Rsa* I, 水解人类 DNA,然后利用基因组杂交印迹,测量所产生的端粒片段的长度(Allshire et al. 1988)。这一过程的前提条件是端粒重复序列缺乏 II 型限制性内切核酸酶的识别序列(de Lange et al. 1990)。然而这种方法无法切除与端粒相邻的不含限制性内切核酸酶识别位点的片段,这就增加了端粒片段的长度和不均一性(见图 10-1)。通过将细胞的 T_2AG_3 重复信号与不同长度的端粒进行比较,可以推断出最末端的 *Hinf* I / *Rsa* I 片段上亚端粒片段的大小。例如,为了解释 8kb 端粒片段 DNA 的 T_2AG_3 重复信号比平均为 6kb 的端粒片段样品多两倍,人们设想两个 DNA 的最末端片段都含有大约 4kb 的非端粒片段(称为 X)(Levy et al. 1992)。其他研究中类似的分析表明,X 片段大约为 2.5kb 左右(Counter et al. 1992)。同时,对人类端粒的序列组成进行的独立分析也表明,含有 3~4kb 的 DNA 端粒片段不能与 T_2AG_3 重复序列杂交(Allshire et al. 1989)。

对所克隆的端粒邻近区域进行的序列分析无法证实这些有关 X 的推测。在大多数克隆的端粒末端中,*Hinf* I 和其他限制位点出现在长 1kb 内的端粒重复序列中,这表明 X 片段很短(Brown et al. 1990),但也可能是带有更长 X 片段的端粒未被克隆。另外还可能是由于限制性内切核酸酶的识别位点发生修饰,使一些亚端粒序列不能被酶解。例如,在亚端粒 DNA 上很常见的胞嘧啶甲基化(de Lange et al. 1990),妨碍了 *Hinf* I 对 GANTC 位点的断裂(McClelland et al. 1994)。由于在不同的细胞类型中(以及在肿瘤的形成过程中),亚端粒的甲基化水平很有可能存在巨大差异,所以这种改变可能对末端限制片段的表观长度有潜在的影响,并改变端粒的动力学。显然,应使用对端粒限制性序列(例如 *Taq* I、*Rsa* I、*Mbo* I)内部或附近的^{Me}C 不敏感的酶来测定端粒末端限制片段(McClelland et al. 1994)。

关于端粒丧失对细胞生存能力和染色体行为的影响,最好应考虑细胞中最短端粒的长度。但目前还没有适当的方法测定其长度。随着定量原位杂交技术的改进以及染色质扩展技术的进展(如 DERVISH 技术)(Parra & Windle 1993),人们将能够测定单个染色体末端端粒重复序列的真实长度。

端粒功能的顺式作用需求

一些证据表明,在人类体细胞中, T_2AG_3 重复序列是端粒发挥功能所需要的惟一序列。例如, T_2AG_3 串联重复序列(而不是其他的序列)在所有的脊椎动物的端粒中都是保守的,而且在一些 α -地中海贫血症病人的 DNA 中加入这个序列可以使断裂的染色体愈合(Meyne et al. 1989;Wilkie et al. 1990;Lamb et al. 1993;Wilkie 1993)。但还有许多关于人类端粒对顺式作用需求的问题没有解决。首先,还不清楚到底需要多长的 T_2AG_3 重

复序列排列。尽管最长的人类端粒可能含有长达 20~30kb 的 $(T_2AG_3)_n$ (de Lange et al. 1990; Hastie et al. 1990; Saltman et al. 1993), 但许多细胞系在每条染色体末端的序列只有平均几 kb (de Lange et al. 1990; Counter et al. 1992; Saltman et al. 1993), 而且在转化的细胞系中单个的端粒还可能更短 (Barnett et al. 1993; Hanish et al. 1994; Murnane et al. 1994)。由于下面两方面的原因, 对这些资料的解释还比较混乱。一方面, 迄今为止所记录的最短的人类端粒发现于转化细胞中, 在那里对端粒功能的需求很可能不十分严格。另一方面与人类端粒长度的极端不均一性有关 (Cooke & Smith 1986; Wilkie et al. 1990; Barnett et al. 1993; Murnane & Yu 1993; Hanish et al. 1994; Murnane et al. 1994), 这使得每个细胞内都可能含有几个比其他端粒短得多的端粒片段。因此, 人类端粒的平均长度不能提供有关单个末端对端粒 DNA 最小需求的信息。

其次是其他序列能否取代 T_2AG_3 重复序列。例如, 还不清楚在人类端粒基部聚集的 T_2AG_3 相关基序能否实现端粒的功能。对此, 我们从人类组织培养细胞的端粒 DNA 转染实验中得到了一些有关信息 (Hanish et al. 1994)。其中引人注意的是, 这些实验中获得的大多数稳定的转染体都携带一个截短了的染色体, 并在其断裂末端引入端粒 DNA。由于转染的 T_2AG_3 重复序列植入了一个具有功能的新端粒 (Cooke 本书), 因此染色体片段是稳定的。在这种情况下, 至少需要 0.5~0.8kb 的端粒 DNA 作为端粒种子 (Farr et al. 1991; Barnett et al. 1993; Hanish et al. 1994), 而且端粒的形成显示了对 T_2AG_3 重复序列的决定性需求 (Hanish et al. 1994)。尽管在 T_2AG_3 端粒种子转染后可观察到新形成的端粒, 而来源于其他真核生物的密切相关的重复基序链不能植入新的端粒 (Hanish et al. 1994)。这些结果表明了端粒形成的严格序列需求, 并预测其功能主要局限于人类端粒最远端片段中精确的 T_2AG_3 重复序列排列。

端粒相关蛋白

人类端粒中存在着大的(数 kb)、不同寻常的、弥散的染色质区域, 这暗示具有不同的核小体组构 (Tommerup et al. 1994; Lejnine et al. 1995)。这种端粒特异性染色质可能与单细胞生物染色体末端发现的较大的复合体(端体)有关 (Fang & Cech 本书)。因此, 分析哺乳动物端粒复合体的关键步骤就是鉴定端粒中的蛋白质 (de Lange 1996)。

对哺乳动物端粒中蛋白质与 DNA 相互作用的初步研究已经发现了几个重要线索。在纯化过程中, 人类的端粒与核基质是共同存在的 (de Lange 1992), 这表明这个亚核部分含有端粒结合因子。在哺乳动物体细胞(包括人的原初和转化细胞)中, 有一个可能的端粒 DNA 结合因子表达, 该因子被称为 T_2AG_3 重复序列结合因子(又叫 TRF) (Zhong et al. 1992)。根据对其体外 DNA 结合活力的研究, TRF 应沿长轴结合端粒的双链部分。转染介导的染色体片段化实验表明, TRF 可在体内结合端粒 DNA (Hanish et al. 1994)。特别是, 体外结合实验显示, 有效的端粒植入所需的序列与 TRF 的识别位点相符。TRF 基因的最新克隆使人们能进一步估价这个人类端粒因子的作用 (T. de Lange et al. 未发表)。

在若干纤毛原生动物中, 富含 G 重复序列的 3' 端粒悬突可与一个蛋白复合体稳定地结合 (Fang & Cech 本书)。生物化学和遗传学资料显示在全鞭毛目纤毛虫、酵母及非洲蟾蜍中都有类似的端粒末端特异性蛋白的表达 (Cardenas et al. 1993; Sheng et al. 1995;

Wiley & Zakian 1995)。这些结果虽然加强了人们对哺乳动物端粒也携带末端蛋白的期望,但在哺乳动物细胞中寻找这种单链结合现象的研究至今只鉴定出了具有显著 T₂AG₃ 链特异性的 hnRNP 蛋白质(McKay & Cooke 1992a,1992b;Ishikawa et al. 1993)。

端粒缩短

体细胞端粒的衰减

在雄性生殖细胞系、胎盘和胎儿细胞中,人类染色体的末端携带 10~20kb 的端粒 T₂AG₃ 重复序列(Allshire et al. 1988;Cross et al. 1989,1990;de Lange et al. 1990;Hastie et al. 1990)。在体细胞发育过程中的某一未知时刻,端粒片段随着连续的细胞分化开始凋萎,结果,与相同供体的生殖细胞株相比,人体细胞的端粒限制片段的长度显著减少(Cooke & Smith 1986)。尽管不能排除端粒末端酶促降解的因素,但引起人类端粒衰减的主要因素是染色体复制策略的缺陷。染色体末端注定缩短的原因曾引起广泛争论,因为 DNA 末端的精确复制需要的活性与细胞中 DNA 聚合酶的活力无关。这些酶或者不用引物就能起始复制,或者只需通过在 5' 末端加入核苷酸就能起始复制(Greider 本书)。在理论上,这个末端复制问题可通过延伸染色体末端(例如通过重组、末端序列转移、在复制中滑动和转座)的任何反应得以解决。但在人类细胞中,端粒 DNA 维持的直接原因似乎是端粒酶。

在人类细胞株[如 HeLa 子宫颈癌细胞和 293 腺病毒转化的胚胎肾细胞(Morin 1989;Counter et al. 1992;Prowse et al. 1993)]的低渗裂解物中很容易检测到端粒酶的活性。但在正常的人类细胞中,很难检测到端粒酶(Counter et al. 1992,1994a,1994b;Kim et al. 1994;Broccoli et al. 1995)。由此,人们将端粒降解归因于体细胞中端粒酶的抑制作用(Hastie & Allshire 1989;de Lange et al. 1990;Harley et al. 1990;Hastie & Allshire 1989;Counter et al. 1992),并进一步推测生殖细胞能够表达端粒酶,从而解释了老年男性精子端粒较长(Allsopp et al. 1992),T₂AG₃ 重复序列在人类多代遗传中持续存在,以及在超过 4 亿年的脊椎动物进化中端粒序列没有变化的事实(Meyne et al. 1989)。最近在人类睾丸和卵巢的抽提物中发现了高水平的端粒酶活性同样证明了这种推测(Kim et al. 1994)。

有三种方法可用来证明人类体细胞中端粒的衰减。首先,一些个体的精子端粒可能比其外周血白细胞的端粒长数千碱基(Cooke & Smith 1986;Allshire et al. 1988;de Lange et al. 1990)。其次,人原初细胞的体外生长过程中可直接观察到端粒的缩短。在这种情况下,成纤维细胞、胚胎肾细胞、骨髓、T 和 B 淋巴细胞、乳腺上皮细胞、子宫颈细胞的端粒在每次群体数加倍的过程中缩短 30~120bp(Harley et al. 1990;Counter et al. 1992;Shay et al. 1993;Vaziri et al. 1993,1994;Klingelhutz et al. 1994)。最后,外周血白细胞、结肠黏膜细胞和皮肤成纤维细胞内的端粒在老年供体中都较短(Harley et al. 1990;Hastie et al. 1990;Lindsey et al. 1991;Allsopp et al. 1992;Vaziri et al. 1993)。这些端粒的衰减速率大约为每年 20~40bp。这个适度的端粒缩短速率可反映出这些组织细胞每年有限的分裂次数和低水平的端粒酶活力。

总之,这些研究结果表明,人类体细胞中端粒的缩短是一种普遍现象。但应该强调的是,目前还不能确切知道每次细胞分裂损失了多少端粒 DNA,也不知道不同的细胞类型中或在不同的发育阶段这个损失速率是否发生变化。此外,目前还不了解人类体细胞端粒动力学调控情况的任何细节。假如真的像酵母中的情况那样(Zakian 本书),那么除了端粒酶外很可能还有其他多种因子参与端粒长度的调控。

肿瘤端粒的衰减

与正常体细胞的端粒一样,人类原发肿瘤细胞的端粒在其发育的某个阶段也经历了进行性序列损失的过程(见图 10-1)。肿瘤细胞的端粒通常比它们附近正常细胞的端粒短,这个事实明显地证明了这种进行性过程的存在。由于不同组织的复制历史可能不同,因而不同组织不能彼此互为参照,所以在测定肿瘤端粒变化时,与恶性肿瘤的假定前体进行比较是十分重要的。此外,因为人类不同个体间端粒长度有很大差别,所以相应的正常组织应来源于同一个体。

肿瘤细胞中端粒的衰减最早见于维耳姆斯氏瘤(Wilms' tumor)、乳腺癌和结肠癌(de Lange et al. 1990; Hastie et al. 1990)。最近,端粒的丢失在人类大多数主要肿瘤类型中都得到了证实(见表 10-1)。通常情况下,肿瘤细胞端粒损失 3~5kb。如果肿瘤细胞端粒的缩短速率同大多数正常体细胞端粒一样快(50~100bp/pd),那么,3~5kb 的端粒 DNA 丢失表明,在最初转化的细胞的无性增殖过程中发生了 30~100 次的累计群体加倍。肿瘤

表 10-1 人类肿瘤的端粒缩短

肿瘤/对照组织	端粒减少频率	端粒缩短范围(平均)		参考文献
维耳姆斯氏瘤/正常肾	2/2	4~5kb	(4.5kb)	de Lange et al. (1990)
乳腺癌/正常乳腺	1/1	2kb		de Lange et al. (1990)
结肠癌/正常黏膜	19/20	1~7kb	(4kb)	Hastie et al. (1990)
结肠腺瘤/正常黏膜	3/3	3~5kb	(3.5kb)	Hastie et al. (1990)
子宫内膜癌/正常子宫上皮	8/11	1.3~10.4kb	(4.3kb)	Smith & Yeh(1992)
ALL、AML、CGL 诊断/缓解	4/6	1.5~5.0kb	(3.2kb)	Adamson et al. (1992)
AML/顽固性贫血	3/16	6.0~6.3kb	(6.2kb)	Ohyashiki et al. (1994)
肾细胞癌/正常肾皮质	10/10	0.4~2.5kb		Mehle et al. (1994a)
卵巢癌腹水	8/8	2~4.5kb	(3kb)	Counter et al. (1994a)
非粘连细胞/粘连细胞				
肺癌/正常肺	12/45	2.5~7.5kb	(5.7kb)	Shirotani et al. (1994)
乳腺癌/正常乳腺	18/22	无报道	(1.6kb)	Odagiri et al. (1994)

细胞的复制期是可以推测的。多数人类肿瘤细胞必须经历至少 30 次的复制才能在临床检测到(1g 或 1cm³),而形成 1kg 的肿瘤至少需要 40 次的分裂。事实上,较高的细胞死亡率(达到细胞生长的 80%)限制了肿瘤的增长,所以肿瘤的潜伏生长期可能远远超过根据肿瘤体积所估计的分化次数。

然而,一些大的肿瘤,其端粒长度出乎意料。例如 Mehle 等注意到一些大的(直径≥5cm)的肾癌细胞端粒似乎只损失了 1.5kb 的端粒 DNA。与之类似的是, Hastie 等在两个结肠癌(根据它们的体积,一定经历了至少 30 次分裂)病例中发现了长的端粒(Hastie et al. 1990; R. C. Allshire 个人通讯)。一种解释是,这些肿瘤的端粒开始时丧失了一部分,但在潜伏期被端粒酶所复原(见图 10-1)。由于这种作用,此时的端粒长度可能并不是反映肿瘤复制史的最佳指标。Mehle 等(1994)也提出端粒长度在肿瘤内部中有巨大变化,这将进一步混淆端粒损失和肿瘤生长时间之间的关系。

肿瘤细胞中端粒功能丧失的证据

短到临界的肿瘤细胞端粒

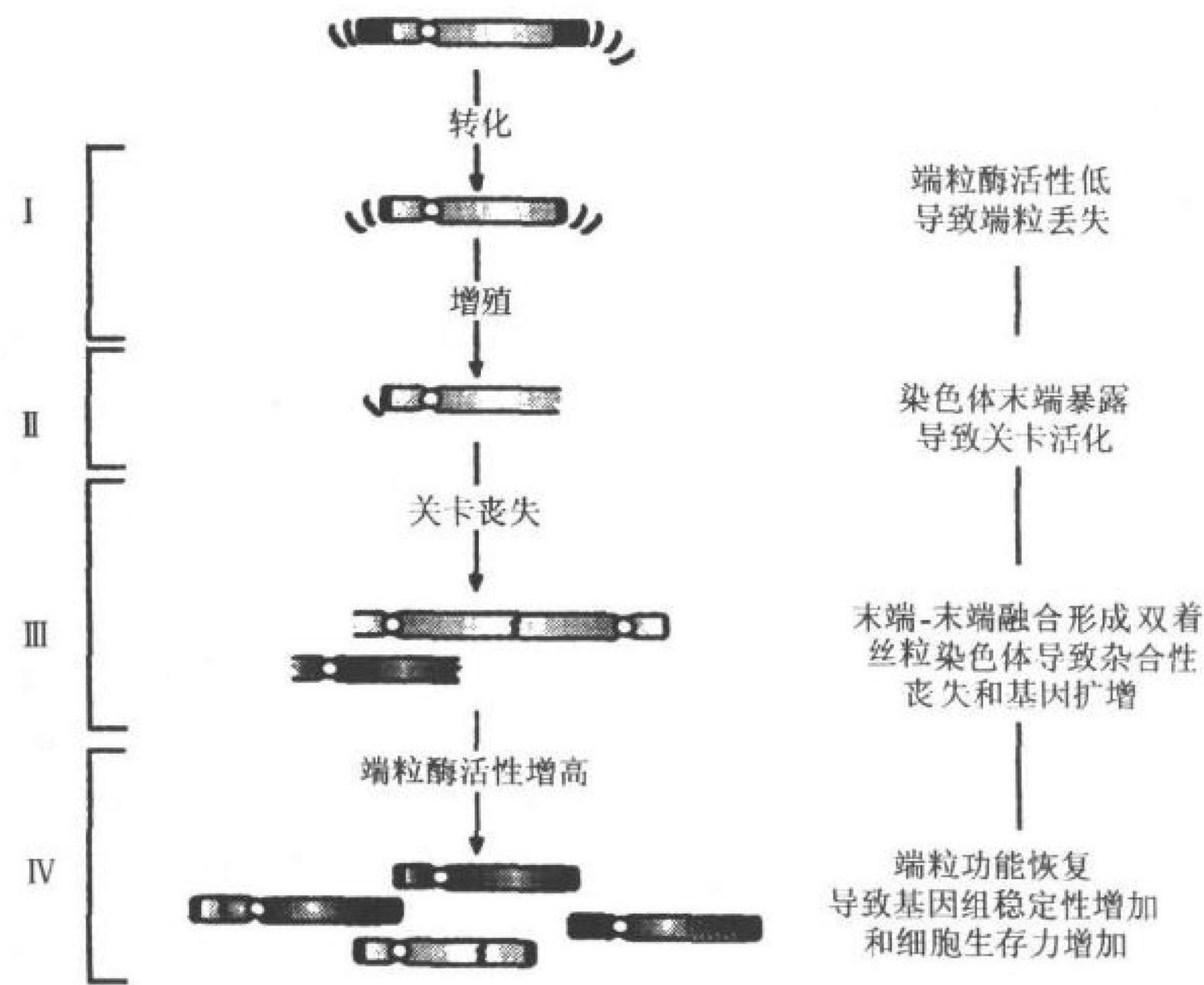


图 10-2 人类肿瘤端粒动力学的推测模型

在阶段 I, 正常体细胞和转化细胞表现出低水平的端粒酶活性, 而且它们的端粒随着每次分裂而缩短。结果, 一个或多个染色体丧失了端粒功能(阶段 II)。暴露的染色体末端能激活 DNA 损伤的关卡并导致细胞周期障碍和(或)细胞凋亡。在失去了这种关卡的细胞中, 未封闭的染色体末端可能导致基因组的不稳定性(阶段 III)。染色体末端融合, 形成双着丝粒染色体, 造成杂合性丧失与基因扩增。在阶段 IV, 端粒酶被激活, 导致端粒功能的恢复。恢复了的端粒可能通过稳定肿瘤染色体组型来提高细胞的生存能力。注意: 阶段 I ~ IV 和肿瘤发生的临床阶段之间没有必然联系。

许多原发性和转移性肿瘤细胞中似乎都有极短的端粒。尽管不可能精确地测定剩余的 T_2AG_3 重复片段的长度,但在某些肿瘤中每个染色体末端 T_2AG_3 重复片段的平均长度只有 1~2kb。由于端粒排列的大小不均一,许多端粒末端必定含有相当少的 T_2AG_3 重复序列 DNA。由于尚未确定人类端粒对顺式作用的最小需求,因而很难估计这些肿瘤细胞中端粒是否濒临功能崩溃的边缘。

完全缺失 T_2AG_3 重复片段的染色体末端是肿瘤细胞中端粒功能丧失的更确切的证据。尽管还没有这种完全丧失功能的端粒的记载,但间接证据表明在一些肿瘤的生长过程中很可能短暂地出现过缺乏端粒的染色体末端。Mehle 等(1994)发现,在一些肾癌中染色体的末端限制片段变短,但并不伴有 T_2AG_3 重复信号的降低。如果这些肿瘤细胞的染色体末端衰减达到亚端粒序列水平,而后端粒酶又修复了端粒,就可解释上述这种矛盾现象。结果,新生的端粒片段可能含有更短的 X 片段,并表现出与其长度不成比例的高 T_2AG_3 重复信号(见图 10-1)。为了证明在染色体末端有缺失端粒的现象发生,有必要寻找人类肿瘤端粒相邻序列的缺失。然而,要证明存在这样未封闭的末端是很困难的,因为它们可能是短暂的、稀有的,并可能只局限在肿瘤发生过程的早期,而此时端粒酶的水平还十分低(见图 10-2)。

端粒缔合

端粒复合体的功能之一是防止染色体末端间的融合。但一些癌症细胞染色体的行为表明其端粒并不能提供这个功能(Hastie & Allshire 1989)。Fitzgerald 和 Morris(1984)首次在两例白血病中注意到一种不正常的双着丝粒染色体。这种双着丝粒似乎含有两个在末端融合的完整染色体,它们被称为端粒缔合(telomere association, TA)。现在,多种不同的肿瘤中都能见到 TA 双着丝粒(见表 10-2)。因为涉及端粒缔合的染色体并不具有肿瘤特异性(见表 10-2),所以 TA 双着丝粒不太可能具有选择性促进细胞生长的优势。相反,肿瘤染色体在末端融合的倾向似乎暴露了这些细胞中(某些)端粒功能的异常。

这些端粒为什么融合尚不为人所知,但人们早就注意到 SV40 转化的肾细胞和衰老的成纤维细胞中存在端粒缔合现象(Yerganian et al. 1962; Benn 1976)。尽管没有被直接测定,但在这两种情况下端粒都可能发生严重地缩短。在最近发现的例子中,TA 的出现与端粒变短之间的关系是十分明确的(Counter et al. 1992, 1994b; Saltman et al. 1993)。尽管短的端粒更易于表现出缔合,但端粒复合体的另一些性质(如端粒蛋白或端粒末端的结构)以及细胞生理学(如 DNA 的修复功能)对 TA 现象的出现可能也有影响(Saltman et al. 1993)。在这一点上,必须牢记迄今为止还无法证明 TA 双着丝粒是由它们的 DNA 末端结合而成的。

TA 双着丝粒的很多性质使它们很难被检测出来。首先,因为在每个细胞分裂中期只有少数 TA 出现,而且通常在一个样本中,半数以上的分裂中期根本没有 TA 双着丝粒(见表 10-2),所以端粒缔合现象很容易被忽略。第二,由于 TA 双着丝粒通常不能无性繁殖,所以它们通常只能存在一次,因此难以被确证。第三,TA 双着丝粒可能主要发生于肿瘤发生过程的早期,端粒酶活化并恢复端粒功能之前(见图 10-2)。根据这些情况,TA 双着丝粒在人类肿瘤中出现的频率可能被低估了。一些主要的人类肿瘤中存在 TA 双着丝粒的事实表明,TA 现象对遗传不稳定性的作用是真实存在的,并极为普遍(见下文)。

表 10-2 人类肿瘤中的 TA

肿瘤类型 (有 TA 的肿瘤/全部)	含 TA 的中期 ^a /%	每个细胞 的 TA ^b	复发/散在 的 TA ^c	通常所涉 及的端粒	不分离;断裂;姐 妹染色单体的 TA	参考文献
血液						
B-PLL(1/1)	17	1~4	4/8	19p,22p	—	Fitzgerald & Morris (1984)
B-PLL(1/1)	3~11	1~2	4/11	17q,19p	不分离	Howell et al(1993)
B-ALL(1/1)	22	1	18/0	(标记)	—	Fitzgerald & Morris (1984)
B 细胞滤泡淋巴 瘤(1/1)	4~28	n. d.	n. d.	1,5,12,17	姐妹染色单体 的 TA	Saltman et al. (1989)
大细胞淋巴瘤 (1/1)	35	1~2	2/22	1p、3p、7p、 7q、8q	不分离	Saltman et al. (1993)
前 T-ALL(1/1)	26	1	2/9	4q,11q		Morgan et al. (1986)
肾						
大嗜酸粒细胞瘤 (1/2)	50	1~2	22/19	19q,20q,22p	不分离	Kovacs et al. (1987)
肾细胞癌(1/18)	50	1~2	4/15	17q,18q	—	Kovacs et al. (1987)
维耳姆斯瘤(1/1)	88	1~12	22/58	7p,12q,14p、 17p,20q	姐妹染色单体 的 TA	Fett-Conte et al. (1993)
维耳姆斯瘤(1/1)	n. d.	n. d.	25/0	7q、9q、11p、 14p	姐妹染色单体 的 TA	Sawyer et al. (1994)
中枢神经系统						
多形性恶性胶质 瘤(1/1)	70	n. d.	n. d.	4p,7p	断裂	Sawyer et al. (1992)
小脑星形细胞瘤 (1/1)	24	1	29/4	12q,12p,15p	—	Sawyer et al. (1993)
小脑星形细胞瘤 (1/1)	80	1	20/0	18p,21p	—	Harrison et al. (1994)
其他						
多形性皮肤纤维 瘤(1/1)	90	1~6	20/21	6p,11p,16q、 20q,21p	姐妹染色单体 的 TA,不分离	Mandahl et al. (1985)
胃上皮纤维瘤 (1/1)	27	1	0/4	12p	—	Seruca et al. (1992)
心肌黏液瘤(3/6)	17~25	1	0/16	2q,12p,22q	姐妹染色单体 的 TA,断裂	Dewald et al. (1987)

续表

肿瘤类型 (有 TA 的肿瘤/全部)	含 TA 的中期 ^a /%	每个细胞 的 TA ^b	复发/散在 的 TA ^c	通常所涉 及的端粒	不分离,断裂;姐 妹染色单体的 TA	参考文献
心肌黏液瘤(1/1)	43	1	6/3	13p,15p	—	Richkind et al. (1994)
巨细胞骨瘤(6/6)	3~37	1~3	2/40	5p,11p,15p, 19q,20q	不分离	Schwartz et al. (1989)
喉鳞状细胞癌 (2/2)	84	n. d.	n. d.	3,5	—	Pathak et al. (1988)
鳞状细胞癌 (1/1)	13	n. d.	n. d.	1p,12q,18p, 22p	姐妹染色单体 的 TA, 断裂	Aledo et al. (1989)
子宫平滑肌瘤 (1/1)	50	n. d.	n. d.	n. d.	—	Nilbert et al. (1989)
子宫平滑肌瘤 (2/5)	4~20	1~2	30/2	1q,12p,12q, 14q	姐妹染色单体 的 TA,不分离	Pandis et al. (1990)
卵巢癌(15/20)	10~38	1~3	0/98	8p, 6p, 10p, 11q	不分离	Mrozek & Limon (1992)
黑色素瘤细胞系 (1/1)	9	1	n. d.	n. d.	n. d.	Saltman et al. (1993)

n. d., 未检测到

^a分析两个以上样品时,其数值范围

^b每个中期的 TA 数范围

^c两个或更多的中期 TA 的复发率/在单个中期出现的特定 TA 的数目

端粒缩短的肿瘤抑制机制

曾有人提出人类原代细胞进行有丝分裂的能力最终会受到端粒缩短的限制(Harley 本书),即由于端粒降解而暴露染色体末端,这种未封闭的末端可能激活 DNA 损伤的关卡并阻止细胞增殖(见图 10-2)。显然,该机制将抑制体细胞的无性繁殖,从而限制肿瘤生长。

利用体细胞端粒的缩短来抑制肿瘤生长的方法可能只适用于长寿命的大动物,如人、鲸、一些海龟和象。由于这种抑制细胞生长的机制只发生在相当大量的细胞分裂之后,因此短寿命的小动物可能无法从中获益。它们可能采用一个能使更短的端粒“融合”或使运行周期加快的计时机制。这两种方法的弱点都在于它们可能很容易限制正常组织的生长和再生。值得注意的是,与人类相比,实验室中的台湾小鼠(*Mus musculus*)细胞株的自发永生化率和端粒长度都有很大的提高(Newbold et al. 1982;Kipling & Cooke 1990;Starling et al. 1990)。但其他小鼠却不具有这种相关性,因为体外生长的 *Mus spretus* 成纤维细胞失去其端粒但却显示出较高的永生率(Prowse & Greider 1995)。

这种肿瘤抑制模型提出了另一个问题:生长中的人类肿瘤是否仍然具有感知其端粒丢失的能力。例如,一个恰当的例子就是 p53 缺失细胞,它们不能感知 DNA 的断裂和异常的纺锤体。这种细胞可能完全不在意偶然的端粒丧失或 TA 双着丝粒的存在。然而 p53 的失活似乎发生在肿瘤生成晚期(Fearon & Vogelstein 1990;Prives 1993)。如果上述理论也适用于其他的 DNA 损伤关卡的话,那么通过对端粒功能丧失的检测就可以进行肿瘤的早期诊断。很明显,必须确定 DNA 损伤关卡消失前,转化细胞是否已经耗尽了端粒 DNA。事实上,可以认为端粒的丢失和由此产生的染色体异常是导致 p53^{-/-}细胞出现的主要原因。

癌症中端粒丧失对遗传不稳定性的影响

肿瘤染色体组型显示了三种主要类型的异常:遗传物质的丧失[杂合性丧失(loss of heterozygosity, LOH)]、基因扩增和染色体重排。理论上,任何一种变化都是由肿瘤细胞中端粒功能的丧失造成的。正如下面要详细讨论的那样,在短端粒的肿瘤细胞中产生的 TA 双着丝粒的异常行为可以直接解释 LOH 和基因扩增现象。

杂合性的丧失

肿瘤抑制基因的丢失是人类肿瘤发生的一个重要因素(Knudson 1993)。如果双着丝粒染色体的两个着丝粒属于不同的纺锤体,则可促进 LOH(见图 10-3)。其结果是在有丝分裂后期产生一个桥,这个桥可通过两种方式破坏:一是通过切断纺锤体器而导致染色单体的不分离现象;另一是通过染色单体的物理断裂而破坏。在任何一种情况下,两个子细胞中的一个可能因缺失某些序列而死亡。

至于 LOH,我们有必要确定是否 TA 双着丝粒确实遵循了图 10-3 中所描述的模式。表 10-2 中所总结的细胞遗传学资料证明了上述模式的存在。首先,TA 双着丝粒似乎是不稳定的。总的来说,每种双着丝粒只存在于一个或几个细胞中,显示了较高的丧失速率。关于 LOH,必须确定不稳定的双着丝粒在不分离和断裂过程中是否确实丢失。已有报道称许多肿瘤中存在着 TA 双着丝粒的不分离现象。在这些情况下,分裂中期 TA 双着丝粒的双拷贝的存在明显地证明了不分离现象的存在(见表 10-2)。此外,在某些情况下,可观察到 TA 双着丝粒在非端粒位点的断裂(见表 10-2)。

还有另一个线索表明 TA 双着丝粒是通过不分离和断裂而丢失的,即 TA 双着丝粒更倾向于发生在染色体 p 臂的端粒间的缔合时或者小染色体上(见表 10-2)。结果,多数双着丝粒染色体中着丝粒与着丝粒间的距离是很短的。如果 TA 双着丝粒的丢失主要是由于它们附着于相反的纺锤体而造成的,那么这种选择就有可能实现。如果双着丝粒染色体的着丝粒间距离很短,那它就不可能附着于相反的纺锤体上,不可能发生染色单体断裂,因而通常可以在正常情况下分配到两个子代细胞中去(见图 10-3A 左半部分描述)。

TA 双着丝粒的细胞遗传学资料表明,它们经常经历不分离和断裂过程,这两个过程都有助于 LOH 的发生。在维耳姆斯肿瘤中,11p 位点上频繁出现 TA 现象(Sawyer et al. 1994),这揭示了 TA 双着丝粒的融合-桥-断裂循环导致肿瘤抑制基因座上 LOH 的机制。这些双着丝粒染色体显得不稳定,染色体组型表现出许多亚克隆,在染色体 11 短臂上有

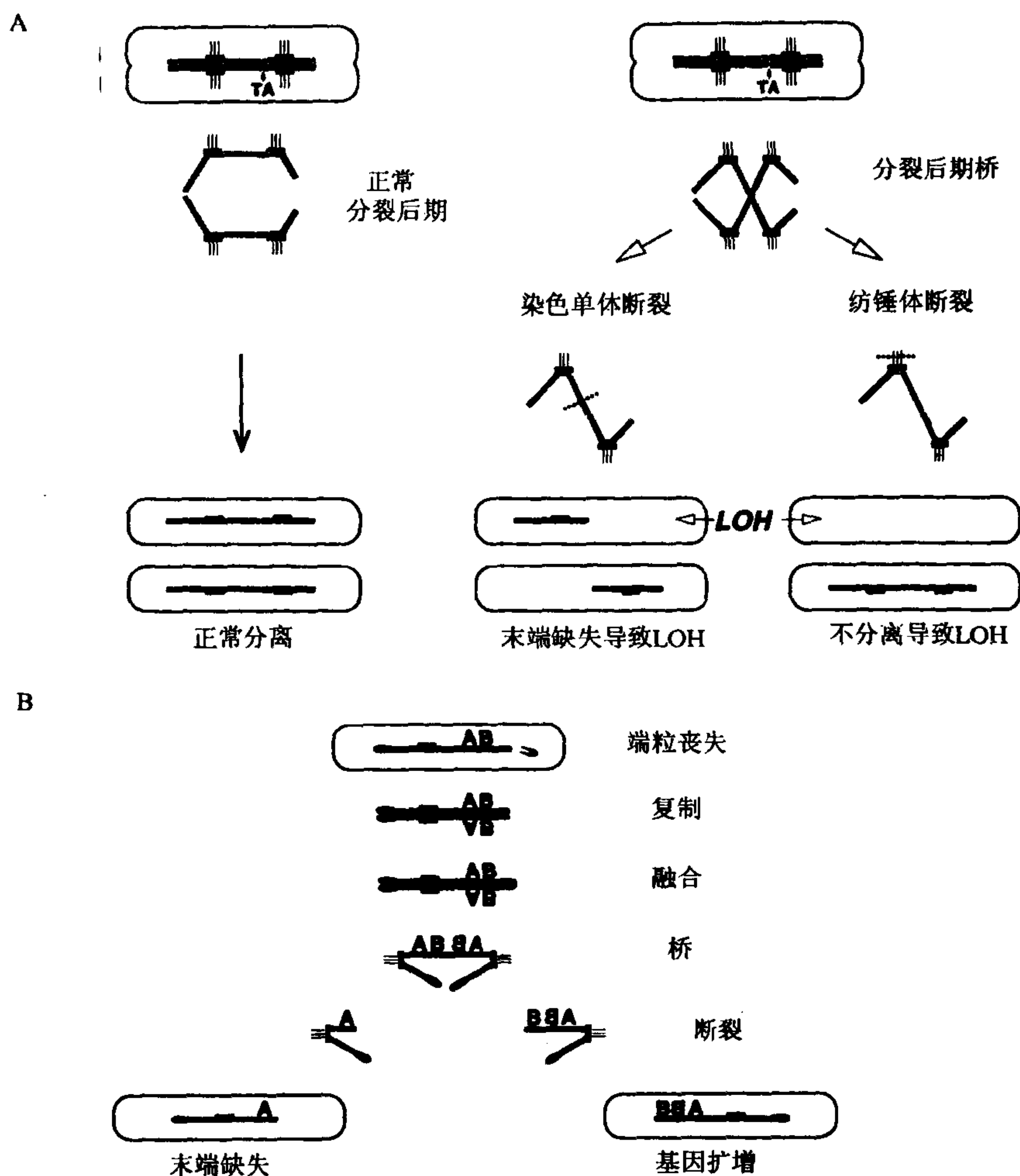


图 10-3 端粒缔合产生的 LOH 和基因扩增

A. 表示了端粒缔合(TA)是怎样导致 LOH 的,图中显示了通过 TA 产生的双着丝粒染色体的两个细胞。这种 TA-双着丝粒可以正常分离(左边的细胞),如果着丝粒位于相反的纺锤体上(右边的细胞)则形成一个分裂后期的桥。如果分裂后期的桥被染色单体的断裂所分解,一个染色体的末端缺失就可产生 LOH。如果分解包括纺锤体的断裂,LOH 就可以由整个染色体的丢失而产生。来源于右边母细胞的子代细胞中,为简单起见,图中只显示一个染色单体的分离。B. 描述了姐妹染色单体的 TA 是怎样产生融合-桥-断裂循环的,该循环可导致基因扩增。注意:两个子代细胞都携带一个具有未封闭末端的染色体,该末端能够进入另外的融合-桥-断裂循环。详细讨论见 LOH 和基因扩增一节。

断裂位点。11p 丢失的物质在一些亚克隆中包括 11p15,在另一些亚克隆中则包括 11p13,这表明 11p 双着丝粒的断裂可能导致在 11p15 和 11p13 上肿瘤抑制基因的丢失(有关肿瘤抑制基因的综述见 Knudson 1993)。

根据其他真核生物的资料,人们可以预测,肿瘤端粒功能的丧失会通过外切核酸酶对前末端基因的降解而导致 LOH(Lundblad & Szostak 1989;Kramer & Haber 1993;

Sandell & Zakian 1993)。然而,就人染色体而言,我们并不清楚无保护末端是否也像酵母中那样容易受到外切核酸酶的影响,或者仅仅随着 DNA 的复制而被动萎缩。如果没有活跃的降解,基因的丢失率就不会很明显,因为末端序列的损失将首先消耗许多千碱基的亚端粒区域(其中尚未发现基因)的碱基对。

基因扩增

McClintock 最早注意到断裂的染色体末端具有融合的倾向,并形成以末端对末端方式连接的姐妹染色单体组成的双着丝粒(见图 10-3)(McClintock 1941,1942)。如果这样的双着丝粒重复进行融合-桥-断裂循环,它们就可积累相同基因的若干个拷贝(Cowell & Miller 1983)。与过度复制形成的基因扩增不同,姐妹染色单体的末端融合容易用来解释在扩增早期产生的大量反向拷贝和双着丝粒染色体(Smith et al. 1992;Ma et al. 1993; Stark 1993)。更多的融合-桥-断裂循环产生了包括反向重复序列在内的复杂模式,该反向重复序列是扩增的基因座所特有的。

显然,导致基因扩增的黏性断裂末端可能来源于端粒衰减造成的端粒功能丧失。在许多肿瘤中都可观察到姐妹染色单体发生缔合的现象,这种缔合是基因扩增的早期阶段(见表 10-2)。此外,含有其他(非姐妹)端粒缔合的双着丝粒也可能经历断裂形成次级断裂末端,并以此启动基因扩增的融合-桥-断裂循环。如果未保护的 DNA 末端的产生是基因扩增的限速步骤,那么肿瘤端粒的状态和端粒酶的水平很可能是决定基因扩增发生频率的主要因素。

人类肿瘤的端粒酶活性

尽管与端粒丢失有关的突变子表型可能促进逐渐变化的肿瘤细胞无性繁殖的演变,但高频率的染色体丢失和基因重排也可能阻止转化细胞的增殖(Boveri 1914)。与此观点一致,用 SV40 大 T 细胞抗原或其他定向到 p53 和 Rb 的病毒因子转化的细胞,将最终进入生长危机,此时细胞分裂与细胞死亡处于平衡状态(Counter et al. 1992)。当端粒被决定性地缩短,而且基因组极不稳定时,就达到了这个生长危机的临界点(Counter et al. 1992)。在此过程中,有些培养细胞会偶尔转化成永生化的细胞株。这些细胞总是表达高水平的端粒酶,从而可修复端粒并部分地稳定其基因组(Counter et al. 1992,1994b; Klingelhutz et al. 1994)。这些细胞永生化的体外模型表明端粒功能的恢复可能也是人类肿瘤生长过程中又一个障碍。

在人类肿瘤细胞中,端粒酶活性的升高是肿瘤细胞受到其端粒状态影响的最佳标志。高的端粒酶活性最早见于转移性卵巢癌的腹水。Counter 等人(1994a)利用“传统”的端粒酶分析方法,在 S100 抽提物中直接证明了端粒酶的活性(Greider 本书),这种方法通过在 T₂AG₃ 梯形标记物中掺入标记的鸟嘌呤来直接在体外检测端粒酶产物(见表 10-3)。平行检测的正常卵巢上皮细胞是阴性的。

表 10-3 人肿瘤细胞的端粒酶活性

肿瘤细胞	检出率(端粒酶阳性/总数)	参考文献
常规方法		
卵巢癌腹水	7/7	Counter et al. (1994a)
急性白血病	0/9	Nilsson et al. (1994)
CLL	1/2	Nilsson et al. (1994)
淋巴瘤	6/7	Nilsson et al. (1994)
骨髓瘤	1/1	Nilsson et al. (1994)
TRAP 法		
原位卵巢癌	15/23	D. Broccoli et al. (未发表)
急性白血病	21/23	Kim et al. (1994); Counter et al. (1995)
急性白血病	(5/5) ^a	Broccoli et al. (未发表)
CLL	2/2	Kim et al. (1994)
CLL	(17/18) ^a	Counter et al. (1995)
CML	(11/11) ^a	Broccoli et al. (1995)
MDS	5/5	Counter et al. (1995)
淋巴瘤	5/5	Kim et al. (1994)
原位乳腺癌	28/38	Kim et al. (1994); Broccoli et al. (未发表)
前列腺癌(PIN3 和腺癌)	5/7	Kim et al. (1994)
平滑肌肉瘤	3/3	Kim et al. (1994)
结肠癌	8/8	Kim et al. (1994)
鳞状细胞癌	14/16	Kim et al. (1994)
小细胞肺癌	4/4	Kim et al. (1994)
脑肿瘤	6/8	Kim et al. (1994)

肿瘤细胞	检出率(端粒酶阳性/总数)	参考文献
维耳姆斯瘤	6/6	Kim et al. (1994)
神经母细胞瘤(Ⅰ~Ⅳ期)	71/71	Hiyama et al. (1995)
神经母细胞瘤(Ⅳ~S期)	5/8	Hiyama et al. (1995)

^a这些肿瘤细胞同正常的外周血细胞和骨髓淋巴细胞相比,并不表现出明显的高端粒酶活性。

Kim 等人(1994)取得了对肿瘤细胞中端粒酶研究的主要进展。他提出了一个极为灵敏的分析方法,采用 PCR 法对端粒酶的体外反应产物进行扩增和标记。这个叫做 TRAP (telomeric repeat amplification protocol)(Greider 本书)的分析方法可用于检测使用表面活性剂抽提的冰冻组织,包括肿瘤活检组织的端粒酶活性。通过这种方法,证明了多数人类肿瘤细胞中存在端粒酶活性(见表 10-3),其中包括如肺癌、结肠癌、乳癌、前列腺癌等人类主要癌症和多数白血病及淋巴瘤。对于每种肿瘤,至少在 60% 的病例中能检测到端粒酶活性。由于在样本处理过程中存在着酶的实验性失活,这个百分率很可能是一个较低的估计数值。因此,高端粒酶活性可能是一个几乎通用的人类肿瘤标记。

在多大程度上端粒酶是一种肿瘤特异性酶呢? 尽管在睾丸、卵巢、胎盘及胎儿细胞中端粒酶的检测结果是阳性的,但 TRAP 分析法并不能在多种正常成人体细胞中检测到端粒酶活性(Kim et al. 1994)。在一些良性病变和体外生长的(危机前的)成纤维细胞中也不能检测到端粒酶,这表明肿瘤中的端粒酶活性并不是细胞增殖状态的简单标志(Kim et al. 1994)。但是,最近的资料表明,在骨髓、外周血白细胞和外周粒细胞、T 细胞、单核细胞/B 细胞富集组分中有端粒酶活力(Brocceci et al. 1995;Counter et al. 1995)。

造血细胞端粒在体外表现出缩短,在体内表现为随着年龄增长而缩短,因此它们的端粒酶活性有些令人不解。一种观点认为在这些细胞中端粒酶的活性不足以满足复制依赖性端粒损耗。另一种观点则认为端粒的动力学不仅依赖端粒酶的表达水平,而且也涉及端粒复合体的其他方面。除端粒酶以外,还有其他因子能够调控端粒的长度,这已在芽殖酵母中得到了广泛证实(Zakian 本书)。最近对 *Mus spretus* 的端粒动力学分析证明体细胞组织中存在端粒酶(Prowse & Greider 1995),而且在爪蟾(*Xenopus laevis*)中也可见体细胞的端粒酶表达(Mantell & Greider 1994)。因此,在脊椎动物的正常体细胞中,端粒酶表达是普遍存在的。

由于 PCR 分析法有难以定量的缺点,因此目前尚未严格确定正常细胞与恶性细胞间端粒酶表达水平的精确差异。利用试剂检测端粒酶 RNA 和蛋白质的进一步实验应该能澄清肿瘤中端粒酶的活化水平。端粒酶基因的克隆也将揭示肿瘤中高端粒酶活性是由端粒酶(或调控)基因突变引起的,或是由其他途径引起的。

肿瘤端粒动力学的综述

以上资料表明,人类肿瘤的端粒动力学是十分复杂的。图 10-2 中的模型可为这些过程提供一个概念上的框架,它描述了一种假想的肿瘤细胞中端粒发展的四个不同阶段。在第一个阶段,端粒缩减但仍很长,足以结合端粒蛋白质并保护染色体末端。在第二个阶段,

在一个或几个染色体末端发生了端粒功能的丧失。由此产生的非保护末端可能会激活DNA损伤的关卡,阻止细胞增殖,并且诱导细胞凋亡。突破这个障碍的细胞似乎缺乏检测未封闭的染色体末端和双着丝粒染色体的关卡。在第三个阶段,这样的细胞可能继续丢失端粒DNA,并进入一个基因组不稳定性增加的时期,有高速率的LOH和基因扩增。普遍的端粒丢失的危害在于,它将最终为那些通过增加端粒酶的表达来恢复端粒功能的细胞提供选择上的优势。在所产生的生长阶段(即第四阶段),肿瘤端粒恢复了功能(尽管它并不一定很长),肿瘤染色体的稳定性得到了提高,而且肿瘤细胞的生存能力也提高了。大多数肿瘤直到发展到第四阶段才能在临床上检验出来。

展望

我们面临的挑战之一是如何更好地理解端粒重复序列的丢失对细胞增殖所产生的抑制作用,以及对基因组不稳定性的促进作用。在很大的程度上,这将依赖于我们对正常人类细胞端粒功能的理解。我们需要更多地了解端粒复合体的结构和组成、端粒复制、端粒防止染色体毁坏的机制以及失去保护端的染色体的命运等方面的知识。此外,我们需要理解细胞周期关卡的本质,因为它可监测端粒的丢失以及由此产生的异常染色体(如双着丝粒染色体)。

癌症基因组的两个特征,即LOH和基因扩增,可被认为(部分)是由肿瘤端粒损失引起的。当然这些线索需要得到确证,但是人们也希望知道染色体末端的缺失还能引起基因组的哪些其他畸形。在端粒缺乏的细胞中,易位是否更频繁?失去了端粒的染色体末端是否更容易受到外切核酸酶的影响?这样的事件在多大程度上依赖于细胞关卡的状况?在不远的将来,人们可以操纵哺乳动物细胞端粒功能的模型系统,那时将能够解答其中的一些问题。

有些出乎意料的是,人类肿瘤细胞中广泛地存在着较高的端粒酶活性。这种普遍性表明端粒酶活性的升高发生于肿瘤生成的潜伏期。原因之一是大多数肿瘤经历了更多的分裂,远比累积的肿块所暗示的分裂次数高,这些肿瘤在潜伏期内耗尽了端粒,而且在症状出现前需要端粒酶介导的端粒恢复。原因之二是,端粒酶以我们未知的方式促进肿瘤的萌发。在肿瘤发育早期呈现出对端粒酶去调节的较强需要,其最终的(也许是可喜的)副作用是端粒的恢复。也许端粒酶的一些变化会改变细胞周期的过程或改变损伤的DNA。显然,有必要知道端粒酶是否只具有恢复肿瘤端粒的功能,还是对转化细胞具有其他的重要功能。

现已有人提出,端粒酶的抑制剂可作为治疗癌症的细胞毒剂(Harley et al. 1990; Counter et al. 1992)。这个观点尚需要彻底的检验。除了与新药研究有关的常见困难外(Gibbs & Oliff 1994),在抗端粒酶药物方面,可能还有一些新的困难。一方面,如果肿瘤的端粒变长(恢复了),则可能在治疗中表现出一种相当程度的表型滞后。另一方面,我们需要知道端粒DNA的逐渐丢失是怎样影响一个整个肿瘤发育的。如果在这种情况下,端粒缩短不是强烈的致死因子,则肿瘤在退化前可能经历一个基因组不稳定性升高的不良阶段。第三个问题是通过酵母和果蝇的观察(Zakian 本书; Pardue 本书),发现在没有端粒酶的情况下也可保持染色体的末端。

抗端粒酶药物的魅力在于它们的副作用可能是很有限的。从表面上看,人类正常细胞的端粒缩短说明它们对端粒酶没有直接需求。事实上,正常组织中端粒酶的水平比大多数肿瘤中低很多,但不能排除(少量的)端粒酶具有其他的功能。可能需要低水平的端粒酶来修饰端粒末端,或者该酶可能是端粒复合体的永久组分。在上述情况下,端粒酶可能不能满足随着 DNA 复制而发生的末端序列丢失,但可以完成正常细胞的重要功能。因此,一旦获得敏感分子探针,仔细观察正常细胞端粒酶的表达是十分有意义的。此外,未来的基因(敲除)实验有可能揭示端粒酶的干扰是否对哺乳动物体细胞无害。

致谢

感谢本实验室成员 Art Lustig, Silvia Bacchetti 和本专题的编辑 Richard Lang 对此手稿提出宝贵意见。感谢 Jerry Shay, Carol Greider, John Langmore, Ginger Zakian, Eric Henderson, 以及 Silvia Bacchetti 慷慨提供他们未发表的资料。本实验室的研究工作得到了国家卫生协会(National Institute of Health), Lucille P. Markey 慈善信托基金(Lucille P. Markey Charitable Trust), Irma T. Hirschl 基金(Irma T. Hirschl Foundation)的资助。

参考文献

- Adamson, D.J.A., D.J. King, and N.E. Haites. 1992. Significant telomere shortening in childhood leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **61**: 204-206.
- Aledo, R., A. Aurias, M.-F. Avril, and B. Dutrillaux. 1989. Jumping end-to-end dicentrics in a case of squamous cell carcinoma from a patient with xeroderma pigmentosum. *Cancer Genet. Cytogenet.* **40**: 95-103.
- Allshire, R.C., M. Dempster, and N.D. Hastie. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeats distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4611-4627.
- Allshire, R.C., J.R. Gosden, S.H. Cross, G. Cranston, D. Rout, N. Sugawara, J.W. Szostak, P.A. Fantes, and N.D. Hastie. 1988. Telomeric repeat from *T. thermophila* cross-hybridizes with human telomeres. *Nature* **332**: 656-659.
- Allsopp, R., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. Younglai, B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 10114-10118.
- Barnett, M., V. Buckle, E. Evans, A. Porter, D. Rout, A. Smith, and W.R.A. Brown. 1993. Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 27-36.
- Benn, P.A. 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. *Am. J. Hum. Genet.* **28**: 465-473.
- Boveri, T. 1914. *The origin of malignant tumors* (Published in translated form in 1929). Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Broccoli, D., J.W. Young, and T. de Lange. 1995. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press).
- Bronner, C.E., S.M. Baker, P.T. Morrison, G. Warren, L.G. Smith, M.K. Lescoe, M. Kane, C. Earabino, J. Lipford, A. Lindblom, P. Tannergard, R.J. Bollag, A.R. Godwin, D.C. Ward, M. Nordenskjold, R. Fishel, R. Kolodner, and R.M. Liskay. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368**: 258-261.
- Brown, W.R.A. 1989. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* **338**: 774-

- Brown, W.R.A., P.J. MacKinnon, A. Villasante, N. Spurr, V.J. Buckle, and M.J. Dobson. 1990. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* **63**: 119-132.
- Cardenas, M.E., A. Bianchi, and T. de Lange. 1993. A *Xenopus* egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. *Genes Dev.* **7**: 883-894.
- Cheng, J.-F., C.L. Smith, and C.R. Cantor. 1989. Isolation and characterization of a human telomere. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6109-6127.
- Cooke, H.J. and B.A. Smith. 1986. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 213-219.
- Counter, C.M., H.W. Hirte, S. Bacchetti, and C. Harley. 1994a. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 2900-2904.
- Counter, C.M., F.M. Botelho, P. Wang, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1994b. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* **68**: 3410-3414.
- Counter, C.M., J. Gupta, C.B. Harley, B. Lever, and S. Bacchetti. 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in haematological malignancies. *Blood* **85**: 2315-2320.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells with express telomerase activity. *EMBO J.* **11**: 1921-1929.
- Cowell, J.K. and O.J. Miller. 1983. Occurrence and evolution of homogeneously staining regions may be due to breakage-fusion-bridge cycles following telomere loss. *Chromosoma* **88**: 216-221.
- Cross, S.H., R.C. Allshire, S.J. McKay, N.I. McGill, and H.J. Cooke. 1989. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* **338**: 771-774.
- Cross, S., J. Lindsey, J. Fantes, S. McKay, N. McGill, and H. Cooke. 1990. The structure of a subterminal repeated sequence present on many chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6649-6657.
- Cross, S.M., C.A. Sanchez, C.A. Morgan, M.K. Schimke, S. Ramel, R.L. Idzerda, W.H. Raskind, and B.J. Reid. 1995. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**: 1353-1356.
- de Lange, T. 1992. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J.* **11**: 717-724.
- . 1996. Telomeric DNA binding proteins in vertebrate cells. *Semin. Cell Biol.* **6**: (in press).
- de Lange, T., L. Shiue, R.M. Myers, D.R. Cox, S.L. Naylor, A.M. Killery, and H.E. Varmus. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 518-527.
- Dewald, G.W., R.J. Dahl, J.L. Spurbeck, J.A. Carney, and H. Gordon. 1987. Chromosomally abnormal clones and nonrandom telomeric translocations in cardiac myxomas. *Mayo Clin. Proc.* **62**: 558-567.
- Farr, C., J. Fantes, P. Goodfellow, and H. Cooke, H. 1991. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7006-7010.
- Fearon, E.R. and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-757.
- Fett-Conte, A.C., H. Liedtke, Jr., H. Chaves, J.A. Thomé, and E.H. Tajara. 1993. Telomeric fusions in a Wilms' tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.* **69**: 141-145.
- Fishel, R., M.K. Kescie, M.R.S. Rao, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J. Garber, M. Kane, and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**: 1027-1038.
- Fitzgerald, P.H. and C.M. Morris. 1984. Telomeric association of chromosomes in B-cell lymphoid leukemia. *Hum. Genet.* **67**: 385-390.
- Gibbs, J.B. and A. Oliff. 1994. Pharmaceutical research in molecular oncology. *Cell* **79**:

193–198.

- Hanish, J.P., J. Yanowitz, and T. de Lange. 1994. Stringent sequence requirements for telomere formation in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 8861–8865.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458–460.
- Harrison, K.J., E. Neumann, D.K. Kalousek, M.G. Norman, S. Masui, and K. Harrison. 1994. Astrocytoma with a unique telomere association. *Cancer Genet. Cytogenet.* **76**: 33–35.
- Hartwell, L.H. and M.B. Kastan. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**: 1821–1828.
- Hastie, N.D. and R.C. Allshire. 1989. Human telomeres: Fusion and interstitial sites. *Trends Genet.* **5**: 326–331.
- Hastie, N.D., M. Dempster, M.G. Dunlop, A.M. Thompson, D.K. Green, and R.C. Allshire. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**: 866–868.
- Hiyama, E., K. Hiyama, T. Yokohama, Y. Matsuura, M.A. Piatyszek, and J.W. Shay. 1995. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med.* **1**: 249–255.
- Howell, R.T., C. Kitchen, and G.R. Standen. 1993. Telomeric associations in a patient with B-cell prolymphocytic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* **7**: 116–118.
- Ishikawa, F., M.J. Matunis, G. Dreyfuss, and T.R. Cech. 1993. Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)_n. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4301–4310.
- Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L.C. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011–2015.
- Kipling, D. and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**: 347–402.
- Klingelhutz, A.J., S.A. Barber, P. Smith, K. Dyer, and J.K. McDougall. 1994. Restoration of telomeres in human papillomavirus-immortalized human anogenital epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 961–969.
- Knudson, A.G. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10914–10921.
- Kovacs, G., R. Muller-Brechlin, and S. Szucs. 1987. Telomeric association in two human renal tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **28**: 363–366.
- Kramer, K. and J. Haber. 1993. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG₁₋₃ repeats. *Genes Dev.* **7**: 2345–2356.
- Lamb, J., P.C. Harris, A.O.M. Wilkie, W.G. Wood, J.G. Dauwerse, and D.R. Higgs. 1993. De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)_n in the α -thalassaemia/mental retardation syndrome (ATR-16). *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 668–676.
- Leach, F.S., N.C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L.A. Aaltonen, and M. Nystrom-Lahti. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**: 1215–1225.
- Lejnine, S., V.L. Makarov, and J.P. Langmore. 1995. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 2393–2397.
- Levy, M.Z., R.C. Allsopp, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley. 1992. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**: 951–960.
- Lindsey, J., N.I. McGill, L.A. Lindsey, D.K. Green, and H.J. Cooke. 1991. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat. Res.* **256**: 45–48.
- Livingstone, L.R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks, and T.D. Tlsty. 1992. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* **70**: 923–935.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation

- leads to senescence in yeast. *Cell* 57: 633-643.
- Ma, C., S. Martin, B. Trask, and J.L. Hamlin. 1993. Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells. *Genes Dev.* 7: 605-620.
- Mandahl, N., S. Heim, U. Kristoffersson, F. Mitelman, B. Rooser, A. Rydholm, and H. Willen. 1985. Telomeric association in a malignant fibrous histiocytoma. *Hum. Genet.* 71: 321-324.
- Mantell, L.L. and C.W. Greider. 1994. Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *EMBO J.* 13: 3211-3217.
- McClelland, M., M. Nelson, and E. Raschke. 1994. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22: 3640-3659.
- McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *zea mays*. *Genetics* 26: 234-282.
- . 1942. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 28: 458-463.
- McKay, S.J. and H. Cooke. 1992a. hnRNP A2/B1 binds specifically to single stranded vertebrate telomeric repeat TTAGGG_n. *Nucleic Acids Res.* 20: 6461-6464.
- McKay, S.J. and H. Cooke. 1992b. A protein which specifically binds to single stranded TTAGGG_n repeats. *Nucleic Acids Res.* 20: 1387-1391.
- Mehle, C., B. Ljungberg, and G. Roos. 1994. Telomere shortening in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 54: 236-241.
- Meyne, J., R.L. Ratliff, and R.K. Moyzis. 1989. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 7049-7053.
- Morgan, R., V. Jarzabek, J.P. Jaffe, B.K. Hecht, F. Hecht, and A.A. Sandberg. 1986. Telomeric fusion in pre-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hum. Genet.* 73: 260-263.
- Morin, G.B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59: 521-529.
- Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, and J.-R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6622-6626.
- Mrozek, K. and J. Limon. 1992. High frequency of telomeric associations and chromatid exchanges and breaks in human ovarian carcinoma. *Hereditas* 117: 259-263.
- Murnane, J.P. and L.-C. Yu. 1993. Acquisition of telomere repeat sequences by transfected DNA integrated at the site of a chromosome break. *Mol. Cell. Biol.* 13: 977-983.
- Murnane, J.P., L. Sabatier, B.A. Marder, and W.F. Morgan. 1994. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J.* 13: 4953-4962.
- Newbold, R.F., R.W. Overell, and J.R. Connell. 1982. Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature* 299: 633-635.
- Nilbert, M., S. Heim, N. Mandahl, U. Floderus, H. Willen, B. Baldetorp, and F. Mitelman. 1989. Complex karyotypic anomalies in a bizarre leiomyoma of the uterus. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 131-134.
- Nilsson, P., C. Mehle, K. Remes, and G. Roos. 1994. Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 9: 3043-3048.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
- Odagiri, E., N. Kanda, K. Jibiki, R. Demura, E. Aikawa, and H. Demura. 1994. Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. *Cancer* 73: 2978-2984.
- Ohyashiki, J.H., K. Ohyashiki, T. Fujimura, K. Kawakubo, T. Shimamoto, A. Iwabuchi,

- and K. Toyama. 1994. Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res.* **54**: 3557-3560.
- Pandis, N., S. Heim, G. Bardi, U. Floderus, H. Willen, N. Mandahl, and F. Mitelman. 1990. Parallel karyotypic evolution and tumor progression in uterine leiomyoma. *Genes Chromosomes Cancer* **2**: 311-317.
- Papadopoulos, N., N.C. Nicolaides, Y. Wie, S.M. Ruben, K.C. Carter, C.A. Rosen, W.A. Haseltine, R.D. Fleischmann, C.M. Fraser, M.D. Adams, J.C. Venter, S.R. Hanilton, P. Peltomaki, J. Mecklin, A.D.I. Chapelle, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1994. Mutation of mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* **263**: 1625-1629.
- Parra, I. and B. Windle. 1993. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization (see comments). *Nat. Genet.* **5**: 17-21.
- Pathak, S., Z. Wang, M.K. Dhaliwal, and P.C. Sacks. 1988. Telomeric association: Another characteristic of can chromosomes? *Cytogenet. Cell Genet.* **47**: 227-229.
- Prives, C. 1993. Doing the right thing: Feedback control and p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 214-218.
- Prowse, K. and C.W. Greider. 1995. Developmental and tissue specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4818-4822.
- Prowse, K., A. Avilion, and C. Greider. 1993. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 1493-1497.
- Richkind, K.E., D. Wason, and H.J. Vidaillet. 1994. Cardiac myxoma characterized by clonal telomeric association. *Genes Chromosomes Cancer* **9**: 68-71.
- Saltman, D., R. Morgan, M.L. Cleary, and T. de Lange. 1993. Telomeric structure in cells with chromosome end associations. *Chromosoma* **102**: 121-128.
- Saltman, D., F.M. Ross, J.A. Fantes, R. Allshire, G.E. Turner, and H.J. Evans. 1989. Telomeric associations in a lymphoblastoid cell line from a patient with B-cell follicular lymphoma. *Cytogenet. Cell Genet.* **50**: 230-233.
- Sandell, L. and V. Zakian. 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729-741.
- Sawyer, J.R., L.S. Goosen, K.C. Stine, and J.R. Thomas. 1994. Telomere fusion as a mechanism for the progressive loss of the short arm of chromosome 11 in anaplastic Wilms' tumor. *Cancer* **74**: 767-779.
- Sawyer, J.R., C.M. Swanson, G.J. Roloson, D.C. Longee, and W.M. Chadduck. 1992. Cytogenetic findings in a case of pediatric glioblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **64**: 75-79.
- Sawyer, J., G. Sammartino, M. Husain, J.M. Lewis, B. Anderson, and F. Boop. 1993. Ring chromosome 12 resulting from nonrandom telomeric association with the short arm of chromosome 15 in cerebellar astrocytoma. *Genes Chromosomes Cancer* **8**: 69-73.
- Schwartz, H.S., R.B. Jenkins, R.J. Dahl, and G. Dewald. 1989. Cytogenetic analyses on giant-cell tumors of bone. *Clin. Orthop.* **240**: 250-260.
- Seruca, R., F. Carneiro, P. Soares, E. Fonseca, and S. Castedo. 1992. Clonal cytogenetic abnormalities and telomeric associations in a fibroxanthoma of the stomach. *Genes Chromosomes Cancer* **5**: 407-409.
- Shay, J.W., W.E. Wright, and H. Werbin. 1993. Toward a molecular understanding of human breast cancer: A hypothesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **25**: 83-94.
- Sheng, H., Z. Hou, T. Schierer, D.L. Dobbs, and E. Henderson. 1995. Identification and characterization of a putative telomere binding protein from *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1144-1153.
- Shirotani, Y., K. Hiyama, S. Ishioka, K. Inyaku, Y. Awaya, S. Yonehara, Y. Yoshida, K. Inai, E. Hiyama, K. Hasegawa, T. Inamizu, and M. Yamakido. 1994. Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer* **11**: 29-41.
- Smith, J.K. and G. Yeh. 1992. Telomere reduction in endometrial adenocarcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**: 1883-1887.
- Smith, K.A., M.B. Stark, P.A. Gorman, and G.R. Stark. 1992. Fusions near telomeres oc-

- cur very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5427-5431.
- Stark, G.R. 1993. Regulation and mechanism of mammalian gene amplification. *Adv. Cancer Res.* 61: 87-113.
- Starling, J.A., J. Maule, N.D. Hastie, and R.C. Allshire. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res.* 18: 6881-6888.
- Tommerup, H., A. Dousmanis, and T. de Lange. 1994. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5777-5785.
- Vaziri, H., W. Dragowska, R.C. Allsopp, T.E. Thomas, C.B. Harley, and P.M. Lansdorp. 1994. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9857-9860.
- Vaziri, H., F. Schächter, I. Uchida, L. Wei, X. Zhu, R. Effros, D. Cohen, and C.B. Harley. 1993. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 661-667.
- Wiley, E.A. and V.A. Zakian. 1995. Extra telomeres, but not internal tracts of telomeric DNA, reduce transcriptional repression at *Saccharomyces* telomeres. *Genetics* 139: 67-79.
- Wilkie, A.O.M. 1993. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: A general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 688-701.
- Wilkie, A.O.M., J. Lamb, P.C. Harris, R.D. Finney, and D.R. Higgs. 1990. A truncated human chromosome 16 associated with a thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* 346: 868-871.
- Wynford-Thomas, D., J.A. Rond, F.S. Wyllie, and C.J. Jones. 1995. Does telomere shortening drive selection for p53 mutations in human cancer? *Mol. Carcinog.* 12: 119-123.
- Yerganian, G., H.M. Shein, and J.F. Enders. 1962. Chromosomal disturbances observed in human fetal renal cells transformed in vitro by simian virus 40 and carried in culture. *Cytogenetics* 1: 314-327.
- Zhong, Z., L. Shiue, S. Kaplan, and T. de Lange. 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4834-4843.

第十一章 端粒的细胞学

Abby F. Dernburg & John W. Sedat

Howard Hughes Medical Institute

Department of Biochemistry and Biophysics

University of California

San Francisco, California 94143-0554

W. Zacheus Cande & Hank W. Bass

Department of Molecular and Cell Biology

University of California

Berkeley, California 94720

端粒行为的细胞学观察历史比我们理解染色体分子结构的历史更长。19 世纪后期积累的证据表明,在一个已知的生物体中,染色体的数目和形态是每个细胞核的共同特征。为了理解这些结构的功能,人们开始研究如何描述染色体的运动、核内的球形组构以及彼此间的相互关系。染色体末端(端粒)和纺锤丝附着位点(着丝粒)是最早被认识的特征。一个世纪以来,它们的行为一直是许多研究的焦点。在本文各章中所述的最新研究表明,端粒是一种特殊序列,它具有避免染色体融合、降解以及影响其遗传活性的作用。这些发现激起了人们理解端粒空间结构及其动力学的新兴趣。

体细胞端粒结构的观察与减数分裂细胞有显著差异。这至少部分是由于控制端粒行为的某些过程对于减数分裂来说是特殊的。由于这些差异,本章我们将分别论述对体细胞核和减数分裂核的观察。

在体细胞核中的端粒组构

检查端粒组构的细胞学技术

一个多世纪以来,人们试图解释决定间期核结构的特征。由于染色体去凝聚化状态的存在使其在典型的显微镜切片中不易识别,因此很难直接观察间期的结构。然而由于细胞核的关键功能、主要基因的表达和染色体复制等在细胞周期的间期发生,因此对间期结构的研究又成了热点。19 世纪 90 年代,在细胞学研究中,可以在有丝分裂期凝聚化状态下用光学显微镜直接观察染色体,进而可以推测间期染色体结构。长期以来,研究者利用可以与已固定的核内的某些基因组序列特异地结合的染料来进行研究,以 DNA 碱基组成和(或)染色体包装程度为基础(Comings et al. 1973)。应用这些染色方法,可以直接得到

间期端粒结构的信息(Fussell 1977)。另一种用来标记间期核端粒的方法是将放射性标记的核苷酸注入有丝分裂活跃的细胞,标记的核苷酸将渗入到晚期复制的序列,包括染色体末端(Fussell 1975)。

除此之外,还发展了使间期染色体人工凝聚的技术,由此产生的表型可以解释并提供有关天然间期组构的信息(Sperling & Rao 1974; Sperling & Lüdtke 1981; Cremer et al. 1982)。在昆虫多线染色体内也可以直接观察到间期组构的特定类型。最近,原位杂交中的非同位素方法使不同发育阶段各种二倍体核的精细序列的检测成为可能。这种方法可以使间期核内端粒的定位观察在三维角度来进行。

电子显微镜也用来解释端粒定位的各个方面。然而直到最近,原位杂交技术在电镜(electron microscope, EM)方面才得到应用。这种方法仅限于减数分裂前期的研究,此时联会复合体(synaptonemal complex, SC)已扩展到整个染色体臂,因此可以检测到染色体末端(见下文)。在缺乏上述结构时,在间期核电镜照片中,不可能识别出端粒的存在。正由于此,本节所述的实验结果几乎均是通过光镜分析获得的。

尽管已经应用了各种方法,但对于间期核内端粒组构的调控规律的确定仍处于早期阶段。虽然大量证据常常互相矛盾,但已观察到端粒表现出的特殊行为:在某些细胞类型中,它们在细胞核呈极化状态,通常局限在核边缘,并且成对地或以其他排列方式成簇排列。在本节,我们列举并讨论了现有的与间期组构各个方面有关的细胞学资料。

作为核极化指示的端粒: Rabl 构象

染色体极性排列的观察早于染色体是遗传单位的证实。1885年, Rabl 初步描述了育螈属(*Proteus*) (一种与美西螈相似的两栖类) 和蝶螈及幼蝶螈的活细胞和固定细胞的有丝分裂染色体(Rabl 1885)。他观察到在细胞分裂后期着丝粒被拉向纺锤体极,并因此位于染色体团的一端,端粒滞后并保留于另一端。这个事实使 Rabl 很吃惊,因为染色体在前期“重新出现”时的表型与它们进入先前的“休止期”(间期)“消失”时的表型基本相同。他总结到,染色体在整个间期都保持着由后期运动所诱导的极性排列,同时 V 型中着丝粒染色体的中心位于一极,而染色体末端位于核对侧的“反极”(gegenpolseite)。着丝粒的聚集比端粒的聚集更加明显,他从不同角度对核所做的描述证实了这一点(见图 11-1)。Boveri (1909) (Wilson 1925) 观察了蛔虫属(*Ascaris*) 胚胎的核分裂,证明染色体在间期并未表现出显著的重新组构,并且在姐妹核中也是如此,染色体排列表现出镜像对称结构。

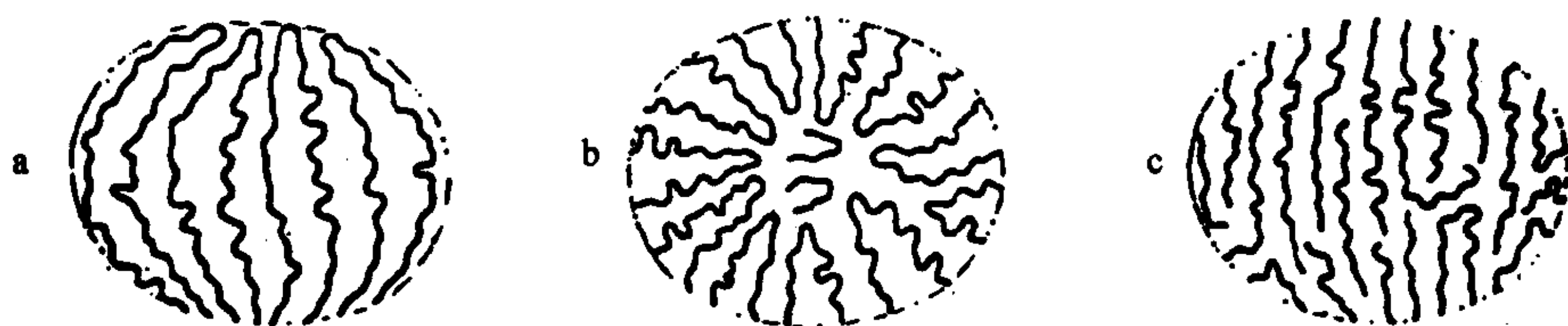


图 11-1 Rabl 描述的前期组构(1885)
三个不同角度的前期核观察:a. 侧面;b. 着丝粒极;c. 对立侧。

此后, Rabl 构象在各种生物体中均观察到。在大量的植物品种中,前期和末期核的标本可表现出极化特征,染色体臂平行排列(见图 11-2a)。然而值得注意的是,为了保持这

种排列方式,压片时必须很轻或在染色前进行(Kitani 1963;Wagennar 1969)。无论是前期染色体还是成熟前凝聚间期染色体,报道的压片染色体较多排列为:着丝粒成簇存在,染色体成放射状围绕在着丝粒周围,端粒位于整个结构的最远处(见图 11-2b)。与之相反,端粒成簇存在而着丝粒围绕着端粒的构象却从未见到。这种现象的一种解释是,决定着丝粒位置的张力比控制端粒位于极化间期核另一端的张力更强,或者至少不会容易通过压片被破坏。

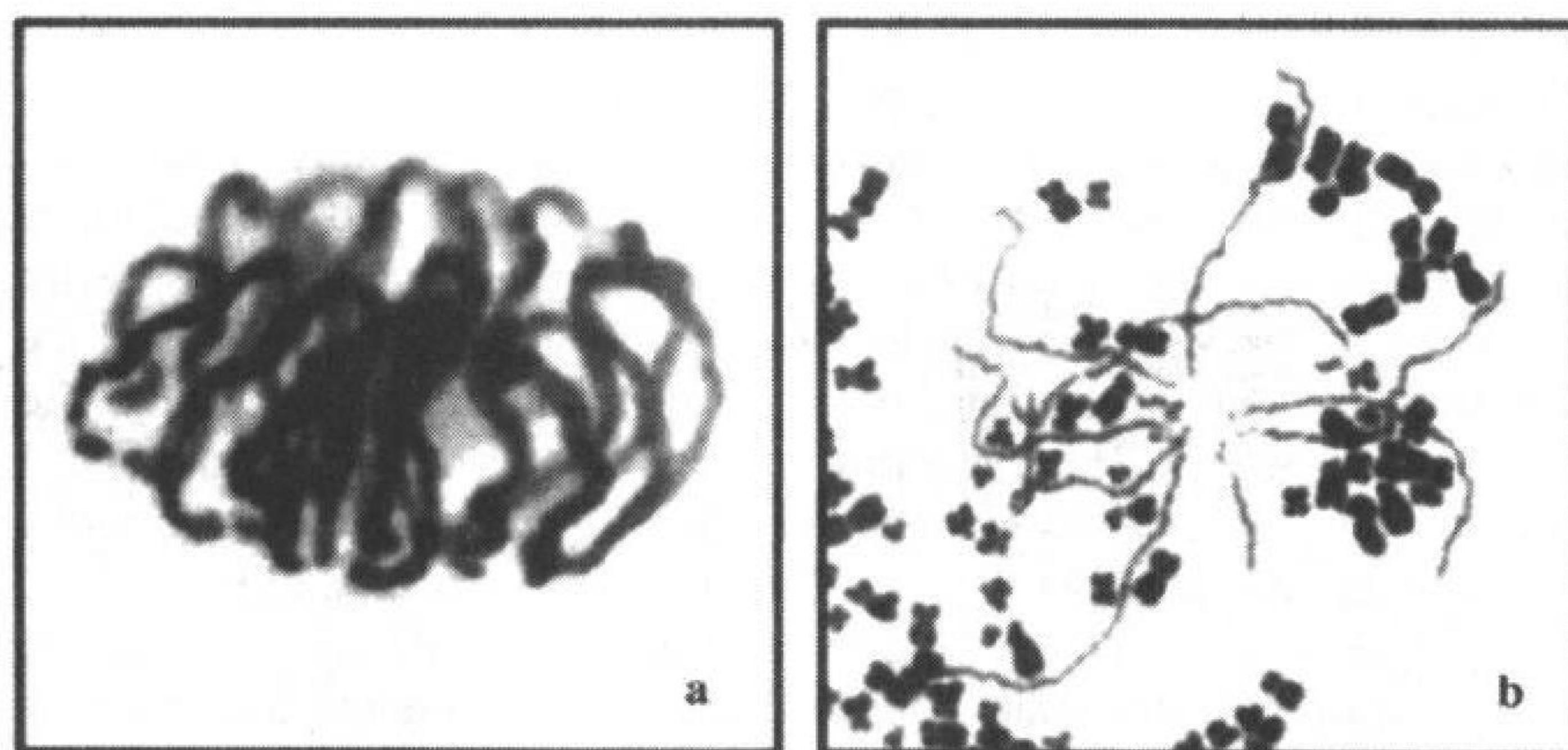


图 11-2 制备的染色体压片

支持 Rabl 构象存在的凝聚染色体的两个现象。a. 某种植物的前期核(Wagenaar 1969),其中染色体臂平行排列 b. 印度麋鹿成纤维细胞成熟前凝聚的细胞核(引自 Sperling & Lüdtkke 1981),着丝粒在核中央聚集,染色体呈放射状排列。小的中期染色体来自用于诱导成熟前染色体凝聚(premature chromosome condensation,PCC)的有丝分裂 Hela 细胞。

到 20 世纪 70 年代早期,已知在用吉姆萨(Giemsa)、富尔根(Feulgen)或其他 DNA 特异染料染色之前,如果用酸、高盐缓冲液和(或)碱处理,就可以通过差异染色来揭示异染色质区。很可能这些技术可以特异溶解并抽提出轻度凝聚的基因组常染色质区域,而留下凝聚程度较高的 DNA 序列(Comings et al. 1973),由此产生的染色体带型取决于处理方法的固有特性。但利用碱性物质来提取的方案一般称为“C 带”方法,并且该方法可以使着丝粒异染色质突显出来。Stack 和 Clarke 证实元葱(*Allium Cepa*)染色体的 C 带区局限于染色体的最远端或端粒部位(Stack & Clarke 1973)。Fussell 在此知识的基础上证实了间期细胞 C 带制片中的端粒极化排列(Fussell 1977)。极化程度呈中度,端粒一般散布于大部分核区,但主要局限于半球的一侧(见图 11-3)。而且极化现象并不仅限于分生(分裂)细胞,而是持续存在于分化的元葱细胞。她认为,端粒的空间排布受每个染色体臂长度的控制(Fussell 1983,1984),并把极化现象的产生归结于 Rabl 构型即后期极化的维持。应用荧光原位杂交技术观察其他两种植物蚕豆(*Vicia faba*)和豌豆(*Pisum sativum*)的端粒(Rawlins et al. 1991),也得到了相似结果。该研究利用三维荧光显微镜研究了保存较好的根尖细胞,在核内观察到了端粒的极化现象。在蚕豆中,其成簇现象非常突出(端粒仅限于核外周约 10%的部位),但在豌豆中相对较弱。端粒成簇现象仅在少数豌豆根尖细胞核中可以看到。

Rawlins 等(1991)的研究结果提出了一个难以解答的问题。当镜像极化端粒定位出

现于姐妹核中时,其方向有时与 Rabl 构型相反:端粒分别位于一对姐妹核的远侧,而不像预期的那样作为后期遗留物相邻存在(见图 11-3)。然而更早的研究表明,这种“反 Rabl 构型”可能就像植物根尖细胞所观察的那样是分裂后核旋转的结果。这种旋转以前在元葱细胞(Vanderlyn 1948)中曾观察到,并且 Vanderlyn 引用了 Heitz 的结论,即蚕豆根尖细胞表现出高频率核旋转(Heitz 1932)。Vanderlyn 还提及 Bělár 发现这种旋转运动独立发生在末期后的两个姐妹细胞中(Bělár 1928)。尽管对于为什么会在植物根尖细胞中发生 180° 的旋转尚未提出很好的解释,但就像线虫(*Caenorhabditis elegans*)早期胚胎核分裂一样,可能这些运动在极化的根组织发育中起作用(Hyman & White 1987)。

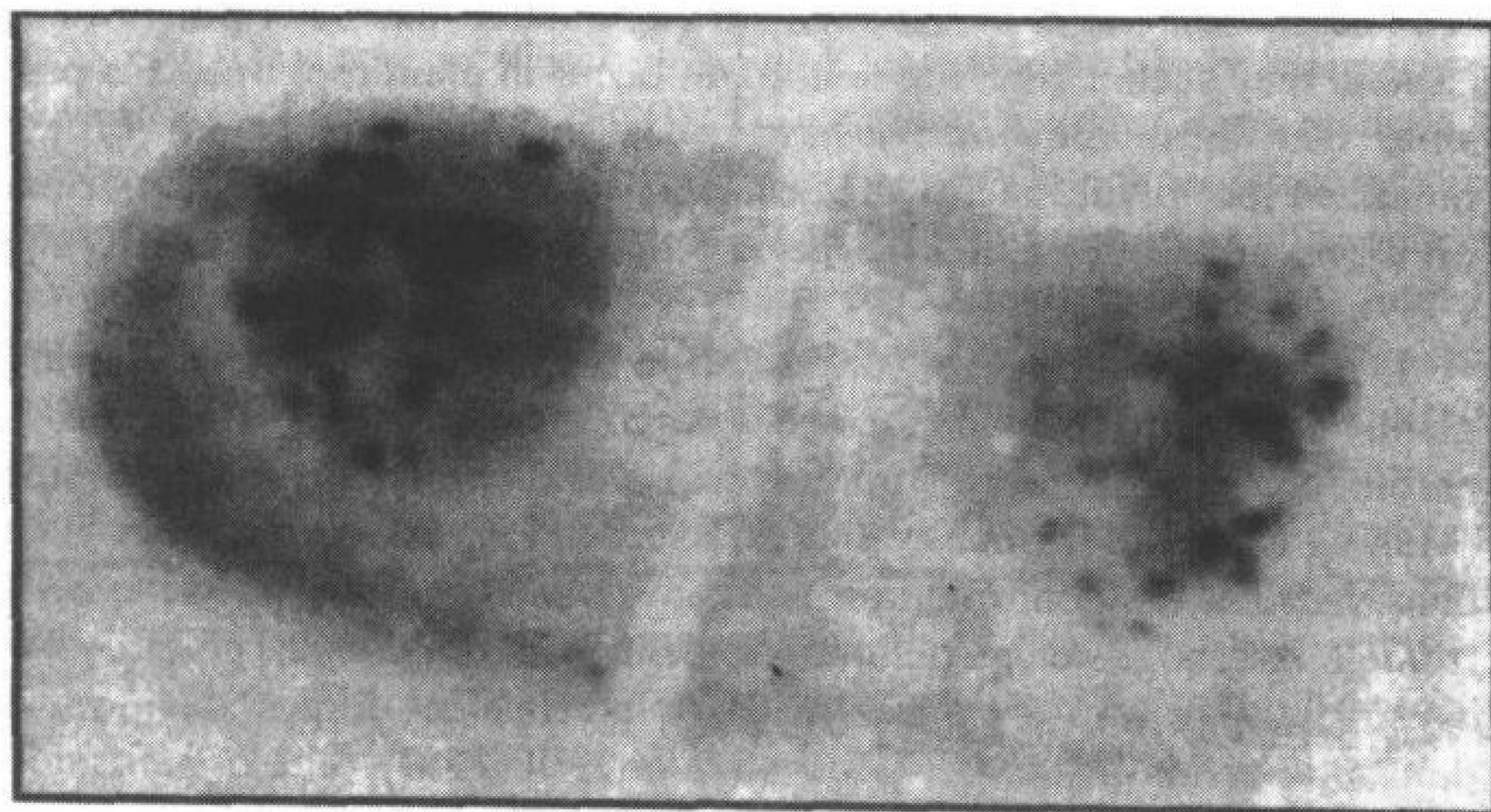


图 11-3 元葱的两个根尖细胞的染色体 C 带

深染的端粒在间期核内呈极化状态(Fussell 1992),不能肯定两个细胞是否是姐妹细胞(C. Fussell 个人通讯),但如果是,则具有“反 Rabl”构型,端粒位于对侧(授权转载 Fussell 1992)。

在果蝇的唾液腺多线核中,Rabl 构型是明显的,核中的着丝粒区融合,在一侧形成染色中心,而端粒则分布于另一侧(Mathog et al. 1984;Hochstrasser & Sedat 1987)。但同时也观察到,在黑腹果蝇的其他多线细胞,尤其是中肠的多线细胞中,其构型是不同的,这可能是由于这些细胞受到内脏蠕动造成的巨大机械力的作用(Hochstrasser et al. 1987)。在黑腹果蝇胚胎细胞核中也看到端粒组构。在缺氧的条件下,间期胚胎中染色体凝聚,位于核边缘,形成容易识别的纤维状。在核的一极可以直接观察到着丝粒,端粒则靠近另一侧(Foe & Alberts 1985)。这种缺氧诱导的凝聚是可逆转的,一旦恢复正常的氧水平,则胚胎恢复正常,这也表明凝聚核可以很容易地恢复到正常的间期排列。应用高分辨荧光显微镜,还可以直接追寻前期和末期囊胚阶段胚胎的单个染色体臂的运动轨迹,同时又出现高度极化的构型(Hiraoka et al. 1990)。然而在胚胎中,极化轴与有丝分裂纺锤体轴方向成 90° 角。核在一个与胚胎表面平行的平面中分裂,但在末期重新定向,从而使所有着丝粒朝向胚胎的表面,而端粒朝向胚胎的内部。这种重新定向可以在注射荧光标记组蛋白的活胚胎中直接观察到(Hiraoka et al. 1989;J. Minden 未发表)。黑腹果蝇胚胎像植物根尖那样,即使核进行着不可思议的旋转,但仍然很明显地保持着 Rabl 着丝粒-端粒极化现象。

在黑腹果蝇胚胎细胞间期核中,利用多种结合到许多基因座的荧光探针杂交证实了特异性染色体的定向现象。在离胚胎表面最远的核区内总能检测到位于大多数染色体臂

末端的探针(Hiraoka et al. 1990; A. F. Dernburg et al. 未发表)。我们现在正在研究分化的果蝇核内是否具有相似的极化构型。

哺乳动物细胞中,Rabl 定向的证据争论更多。一种研究方法是成熟前染色体凝集法(premature chromosome condensation, PCC)。这种方法利用病毒介导的间期和有丝分裂细胞融合,导致间期染色体的凝聚,并使之可以在光镜下观察到(Sperling & Rao 1974)。当利用该方法对印度麋鹿成纤维细胞核(Sperling & lüdtke 1981)或中国仓鼠细胞系的成纤维细胞核(Cremer et al. 1982)进行研究时,染色体散布方式通常为着丝粒在中央成簇存在,其染色体向外呈放射状排列,端粒位于最远端(见图 11-2b)。这与 Rabl 构型一致,但不能排除其他可能的染色体排列方式。为了以不同的方式来研究极化现象,用紫外线照射间期核的特异亚核区,以引起 DNA 损伤并刺激修复(Cremer et al. 1982)。在 DNA 修复过程中,标记核苷酸被结合。当核进入中期时,位于放射处理区的染色体部位可以沿散布的中期染色体纵长进行粗略构图。当细胞的一侧经放射处理时,结合标记的少数染色体(在 9 个不同细胞中,4/39 的染色体)在两端表现出 DNA 修复,而不是在中央发生。这也暗示了末端位于某个远离着丝粒近端区域的核区内。这种相当间接的方法的分辨率受两方面因素的限制,一是聚焦光束的能力,二是放射自显影时沿中期染色体上的银染颗粒作图的准确性。

在哺乳动物细胞核中更加直接的考察染色体极化现象的方法是应用 FISH。在人类神经组织大量不同的细胞类型中,发现了与 Rabl 构型相矛盾的证据(Manuelidis & Borden 1988)。端粒探针定位的核区也同时发现了大部分着丝粒。在小鼠和人类间期核内,由于尚未检测到明显的着丝粒和端粒的极化现象,因此有一些报道对 Rabl 定向普遍存在这一观点提出了怀疑(Billia & de Boni 1991; Vourc, h et al. 1993)。

证实真实的 Rabl 极化现象的最好实验方法应该是:着丝粒和端粒都可以在间期核内一起检测,显示它们分别位于相反的两极。然而迄今为止,仅有极少的例子中可以做到这一点。Funabiki(1993)等利用原位杂交在裂殖酵母中同时观察到了着丝粒和端粒,尽管两种序列从未在同一细胞中进行检测,但却分析了两者相对于纺锤丝极体的位置,且由此被定位于核的相反端。与之相反,在人类神经细胞中,着丝粒和端粒并非较明显地位于相反的极,两者的染色区域也没有在细胞的胞质极化中表现出明显的极化现象(Manuelidis & Borden 1988)。然而,本文列举的证据证实了端粒具有极化现象,至少在一些间期核内呈现出非随机分布。

端粒与核膜的结合

现在仍然不知道所观察到的 Rabl 定向仅仅是后期染色体运动的被动结果,还是在间期维持极化现象所要求的主动过程。端粒位于或接近核边缘的大量观察结果暗示了后者可能是正确的。这使人们认识到端粒可以直接地,也可能通过端粒结合蛋白间接地与核膜发生相互作用。在活细胞中,Boveri 直接观察到了这种作用,同时注意到蛔虫属胚胎的末期和前期核的端粒可能出现在核膜的小凹陷或外凸处(Boveri 1909; Wilson 1925)。在几乎每个有关低等真核生物和植物的间期端粒定位的研究中,都认为染色体末端位于间期核的边缘。

在元葱、蚕豆和豌豆根尖细胞等植物体细胞中端粒与核膜的邻近现象已见报道

(Fussell 1975; Rawlins et al. 1991), 并都显示了某种程度的核极化现象(见上文)。Fussell 已证实, 间期端粒与核膜的明显结合不会因为用秋水仙素处理根尖而遭到破坏, 暗示着这种结合很可能不依赖于微管的持续作用力。Rabl 构型和端粒的边缘定位还对由组织超速离心所引起的作用力有抵抗作用(Fussell 1992)。

在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 也有端粒位于核边缘的报道。在裂殖酵母中, 资料来源于 RAP1 抗体的免疫染色技术(Klein et al. 1992), RAP1 是一种与端粒和许多启动子序列结合的蛋白质。这种方法的有效性将会在下文述及。在裂殖酵母中, 原位杂交表明在 DAPI 染色的染色质团边缘检测到了亚端粒 DNA 探针的存在(Funabiki et al. 1993)。在锥虫中, 应用端粒探针 FISH 方法已鉴别出三种不同种类的端粒分布(Chung et al. 1990)。锥虫在其两类宿主(昆虫和哺乳动物)中以不同的形式存在。通过对昆虫型和血流型锥虫核的研究, Chung 等观察到在整个核内端粒是成簇分布的, 端粒与核边缘结合在一起, 少数核(<30%)的端粒聚集在一极。在所有这些单细胞真核生物中, 由于核的体积小, 因而很难估计所观察的亚核定位的意义, 正如下面“实验研究”中所讨论的那样。

果蝇唾液腺多线染色体核的直接观察已经证实, 染色体末端直接位于核膜下(Mathog et al. 1984; Hochstrasser et al. 1986)。但是像 Rabl 构型一样, 这个规律在其他多线组织如幼虫肠内, 并不总能观察到(Hochstrasser & Sedat 1987)。包括端粒在内, 大量的与特异性异染色质相对应的其他位点也在唾液腺核的核膜处高频率地出现(Hochstrasser et al. 1986)。

值得注意的是制备方法, 尤其是组织石蜡包埋, 可以影响所检测的与核膜有关的染色体分布。Katsumata 和 Lo(1988)应用原位杂交研究了许多小鼠组织中核内着丝粒和端粒 DNA 序列的分布。在石蜡包埋样本中, 包括整个小鼠基因组 DNA 在内的所有杂交信号都位于核边缘。与之相反, 在没有包埋的组织中杂交, 基因组序列分布于整个核内。而 3 号染色体端粒探针依然定位于边缘, 说明它的边缘定位不是一种人为现象。但另一个小鼠细胞核原位杂交的研究没有发现端粒信号定位在淋巴细胞核边缘的倾向(Vourc, h et al. 1993)。事实上, 端粒在这些核中表现出的内部定位频率比球型核内所预期的点随机分布频率更高, 这是迄今为止仅有的端粒分布同理论期望值的比较研究。值得注意的是在固定和杂交前用去垢剂 Triton X-100 处理了淋巴细胞核, 可以影响酿酒酵母核中 RAP1 抗体染色的位点数目, 并且可能影响端粒的分布(Palladino et al. 1993a, 1993b)。而且已经证实, 固定前用去垢剂对分离核进行处理, 对电镜下观察染色质的组构有很大的影响(Belmont et al. 1989)。

电子显微镜已经证实, 在减数分裂细胞中端粒位置接近核边缘(见下文)。然而这种方法尚未精确地应用于间期核研究。从元葱(*Allium fistulosum*)得到的电镜切片中, 深染的假定异染色质区可以在减数分裂前间期的核边缘观察到(Church & Moens 1976), 但不能肯定地说这些区域代表了染色体末端。一个研究中应用金标记抗体检测间期淋巴细胞核中相对于简单端粒重复序列的生物素探针, 结果可以在边缘检测到少许信号(Steinmüller et al. 1993)。然而大部分端粒在图中没有出现, 也未得出有关核膜附着的一般结论。随着该技术的改进, 透射电子显微镜与原位杂交结合, 最终使端粒在许多细胞类型中的高分辨定位成为可能。生化方法与电镜超微结构方法的结合将作为研究端粒核膜附着问题的重

要方法,这是因为光镜提供的分辨率是有限的,因此,光镜下的细胞学检查只能提示,但不能证实附着现象。

核边缘为什么会有端粒存在?

端粒经常在体细胞核远离中心部位被发现,这一观察结果使人们产生了这样的推测,即是什么原因产生了这样的定位,其意义何在?生化技术已证实,是人类端粒 DNA 而不是内部端粒重复序列可以与核基质相互作用(de Lange 1992)。尽管至今还未能证实端粒重复序列与核膜蛋白的特异结合,但是一些方法如 UV 交联等也许能使之在未来被检测到。

现在我们仅能推测有关位于核边缘的端粒细胞学观察的意义。端粒很可能通过与核膜结合来锚定染色体,由此在细胞分裂间期为染色体的大规模重新组构提供阻力并避免染色体臂的缠绕。另外,端粒与核膜的结合也许简化了染色体间的同源检索(homology search),从而避免在整个三维核内进行。同源端粒与 Rab1 定向一起被大致限制在同一平面上,从而降低了彼此进一步寻找的复杂性(Fussell 1984,1987)。然而,这还不能解释端粒/核膜结合为什么会发生在体细胞间期。尽管有一系列的证据表明至少在某些间期体细胞内同源染色体确实是结合的(Avivi & Feldman 1980; Tartof & Henikoff 1991),但这种结合可能不是间期组构的普遍特征。

端粒边缘定位的另一个功能可能与亚核定位和遗传调控有联系。这是由于抑制转录的蛋白质被招募于核的边缘。由于这样的边缘定位,端粒使与之相近的连锁基因处于某种抑制状态,这就是所谓的“端粒沉默效应”(Shore 本书)。然而,支持这个沉默模型的仅有的细胞学证据依赖于一种非直接检测端粒定位的方法:RAP1 抗体染色法。

RAP1(repressor activator protein 1,抑制子-激活子蛋白 1)是一种转录因子,结合于酿酒酵母许多启动子序列,具有激活和抑制转录两种活性(Shore & Nasmyth 1987)。已经发现它在体外与酿酒酵母端粒重复序列($G_1\sim_3A$)以高度亲和力结合(Berman et al. 1986; Longtine et al. 1989),并且可以影响端粒长度的维持(Lustig et al. 1990)和带有端粒序列的质粒的稳定性(Longtine et al. 1993)。由于已经证实最强的 RAP1 免疫荧光定位于酿酒酵母散开的减数分裂染色体末端,Klein 等(1992)推测确定 RAP1 的定位与确定间期核端粒区域的定位是等价的。他们发现抗 RAP1 抗体使原生质球点状着色,并在核边缘最为显著。尽管通过用 RAP1 抗体免疫金标记酵母细胞核检测到的大量颗粒基本上随机分布于整个细胞核内,但上述结果与电镜观察的抗 RAP1 抗体的边缘聚集相一致。最近以来,Palladino 等(1993a,1993b)通过免疫荧光技术已证实,在 *SIR3* 或 *SIR4* 两个基因突变体中,RAP1 定位类型更加分散并缺乏显著的边缘点状分布,这两个基因参与沉默信息调控,并且为端粒沉默所必需的。RAP1 的分布变化反映了端粒的行为,根据这一推测,研究者认为这说明了 *SIR3* 和 *SIR4* 蛋白质在染色体末端的正常聚集和边缘定位中起作用。

尽管 RAP1 免疫定位类型引起了人们很大的兴趣,但人们更有信心应用 FISH 方法直接进行端粒的观察。我们已开始对完整的、三维保存的酵母细胞进行杂交从而进行这类试验(A. F. Dernburg et al. 未发表)。通过免疫荧光与原位杂交技术相结合,我们能够对端粒 FISH 信号分布与 RAP1 蛋白质和一种核边缘的标记(由单克隆抗体 MA b414 识别

的核孔抗原)进行比较(Davis & Blobel 1987)。我们相信这非常重要,因为像 DAPI 或碘化丙锭这样的 DNA 染料可以引起核界限的错误指示(Loeb et al. 1993)。初步资料表明,在不同时期的酿酒酵母细胞中端粒并非专一性地定位于边缘部分。我们正在进行统计分析来观察端粒分布是否与随机分布具有显著差异。而且我们已清楚,在被认为影响 RAP1 蛋白定位的突变体中,RAP1 的免疫染色对端粒来说并不是一个可靠的标记。在 *sir 3* 和 *sir 4* 突变体中,端粒 DNA 序列的 FISH 定位与野生型比较没有区别。由于在 *sir 3* 和 *sir 4* 突变体中端粒定位似乎不受影响,而端粒的沉默效应被破坏,因此上述结果表明靠近核膜或位于核膜上某区的基因位点的定位不足以使转录停止。

尽管在酵母中基因与端粒的连接对其转录有负面影响,但这些效果仍限于很近的连锁基因,在几十个碱基范围内,而不是在几千碱基范围内(Shore 本书)。通常缺乏端粒序列的环状染色体可以在黑腹果蝇(Mathog & Sedat 1989;Lindsley & Zimm 1992)、酿酒酵母(Klar et al. 1983)和裂殖酵母(Fan et al. 1992)中替代正常染色体。这一点说明尽管端粒的接近可以影响其遗传活性,但对一些所给出的位点来说并非调控的基本因素。然而在某些实验中,端粒区域确实限定在核边缘位置,这也许是染色体有丝分裂行为互相作用而不是遗传调控的结果。

在间期,当端粒确实具有特殊的亚核定位时,确定其非随机排列的原因将是十分重要的。至少存在着三种可能性:①正如 Rabl(1885)提出的,端粒保持着与其末期构型相似的定位方式;②端粒与局部的核成分特异结合;③由于染色体其他部位行为的结果,端粒呈现出非随机排列。例如,如果活性染色质被主动保持在核内部,则非活性区域可能会被简单地排斥于该区之外。

我们很有可能尚未意识到端粒的核膜附着这种生物学现象的实际重要性。也许我们仍未寻找到有关端粒附着的最关键问题。

端粒-端粒缔合

尽管 Rabl 构型也许会被解释为后期染色体移动的结果,但又有人描述了一种不同的端粒行为,预示着某种主动过程的存在。大量的研究结果为间期核端粒的聚集提供了证据,更使人不可思议的是,它们以成对的方式互相作用,并使核内所有染色体连成一条链。显示这种排列方式的显微镜观察自 20 世纪早期就有记载,并使人们认为在间期核内染色体形成一条连续的“螺旋”或链。然而早在 1937 年,Darlington 就对这些资料表示了怀疑,并指出“很明显如果处理方法有缺陷,则染色体的自由末端非常容易坍塌”。也就是说,由固定和脱水造成的假象也许使人对端粒行为产生错误认识(Darlington 1937)。Vanderlyn(1948)也指出“某些固定剂很明显会引起染色体末端的聚集,从而形成螺旋型链,而其他固定剂则揭示了分离的、极化的染色体……”。尽管如此,染色体的末端-末端缔合问题依然是悬而未决的。自 Darlington 时期以来所获得的资料支持了这种观点,即至少在某些生物体中,体细胞染色体有明显的表现出链式构型的倾向。如果在细胞压片中观察到了端粒成簇现象,那么记住 Darlington 对人工假象的观点是很重要的:即染色体以随机方式聚集在一起可能是由固定方法引起的。但很难想像固定方法如何导致如图 11-4 所示的那种精确的染色体末端-末端缔合。

染色体以其末端连锁在一起的一些资料来源于植物细胞核。Wagenaar(1969)研究了

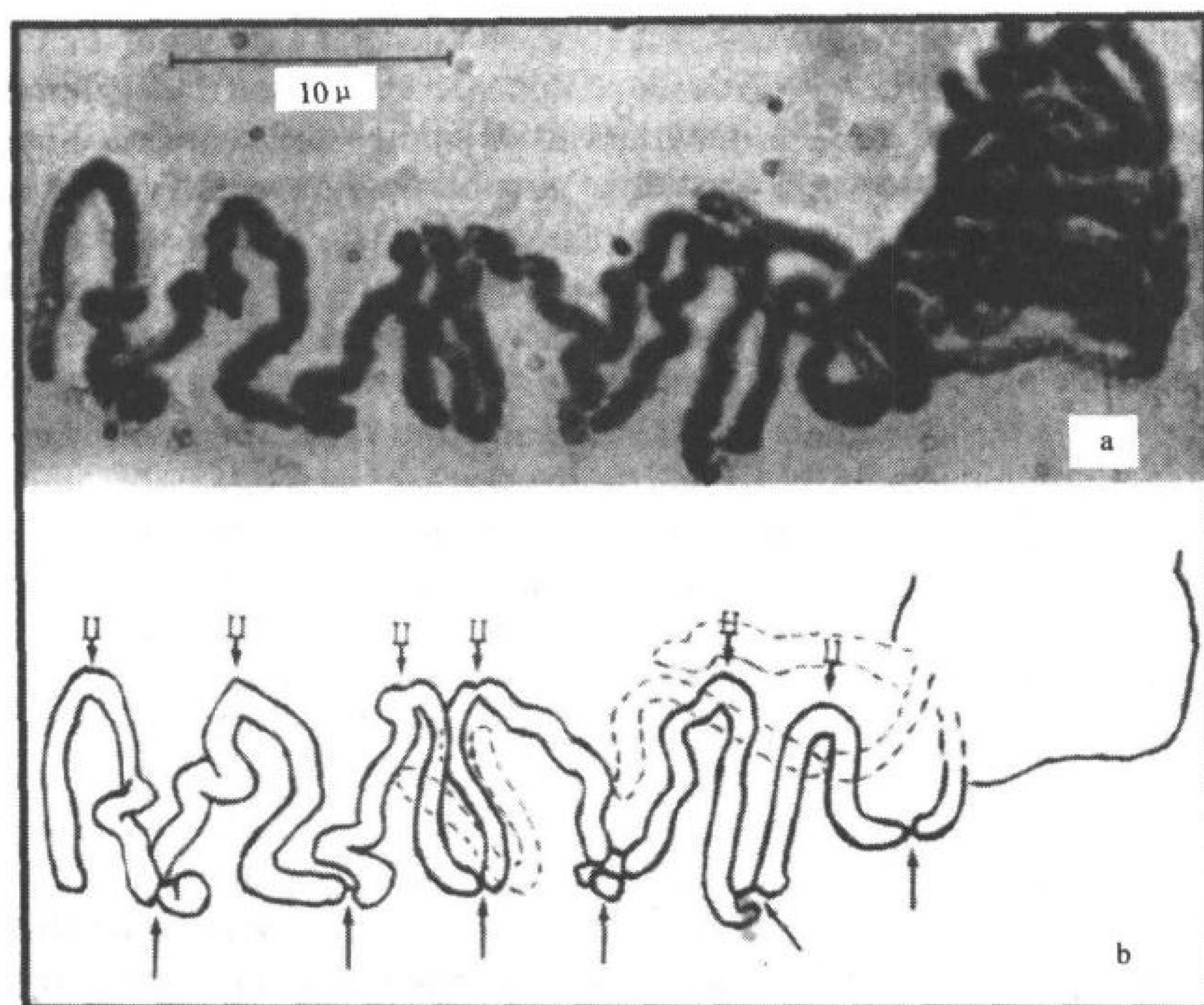


图 11-4 端粒的末端-末端附着

a. 植物前期核的压片制备导致了染色体臂的散布。b. 图解，I 表示着丝粒区，箭头指向端粒，染色体表现为成对缔合。（经允许翻印自 Wagenaar 1969。）

四个不同植物品种的前期压片，并观察到在良好的压片中染色体似乎缔合在一起。Stack 和 Clarke (1973) 应用染色技术检测了元葱染色体，这种技术特别适用于发现染色体末端的异染色质。在这两项研究中，某些载片显示出连接着前期染色体端粒的纤维。Stack 和 Clarke 还在中期分裂相中观察到这样的结合现象。尽管 Wagenaar 没有报道保留到中期的缔合，但这也许是由于两个研究所采取的固定方法和(或)染色技术不同所致。尽管大多数染色体在载片中未表现出末端-末端缔合，但 Stack 和 Clarke 注意到当压片的力量相对较轻时更容易观察到这种缔合现象，这与在分裂相中分析染色体分离程度是相同的，并由此推断大部分缔合已经在处理过程中被破坏了。同源及异源染色体间的缔合也已被观察到。Stack 和 Clarke 运用染色技术揭示出间期典型的深染小体的数目大约为预计端粒数目的一半。他们认为这个结果可能像 Wagenaar 报道 (1969) 的那样由染色体末端融合所引起。应用 C 带方法和晚期复制 DNA 放射性标记法，Fussell 也检测到深染端粒，但比预期的数目少，因此确认在元葱的间期核内有端粒-端粒附着的存在 (Fussell 1975, 1977)。这种附着在后期是检测不到的 (Stack & Clarke 1973)，这一结果表明，在每个细胞周期必须重新形成附着，这样在间期才可观察到这种现象。

应用优先染色技术对具有染色体数目较少 ($2n=6$) 这一细胞学优势的万年青 (*Ornithogalum virens*) 的核压片进行了类似的研究 (Ashley & wagenaar 1974; Ashley 1979)。在其二倍体细胞中，可以观察到同源和异源端粒间的缔合。万年青的染色体倾向于以一种固定的方式结合，这也许是由于其染色体数目较少以及彼此靠近的长度相似的染色体臂

之间的少数交换。与此结果相反,在豌豆和蚕豆间期核中,原位杂交检测到的端粒数目和已知的染色体末端数目之间有一个大约为一对一的对应关系,这说明端粒没有融合(Rawlins et al. 1991)。在有些实验中,可观察到两个信号彼此接近,但也许是一种随机分布的方式(见图 11-5,讨论在“实验研究”中)。而且,所谓的端粒“紧密”配对实际上是两个信号相距 1 微米以上,从分子水平上说这是一个很大的距离。

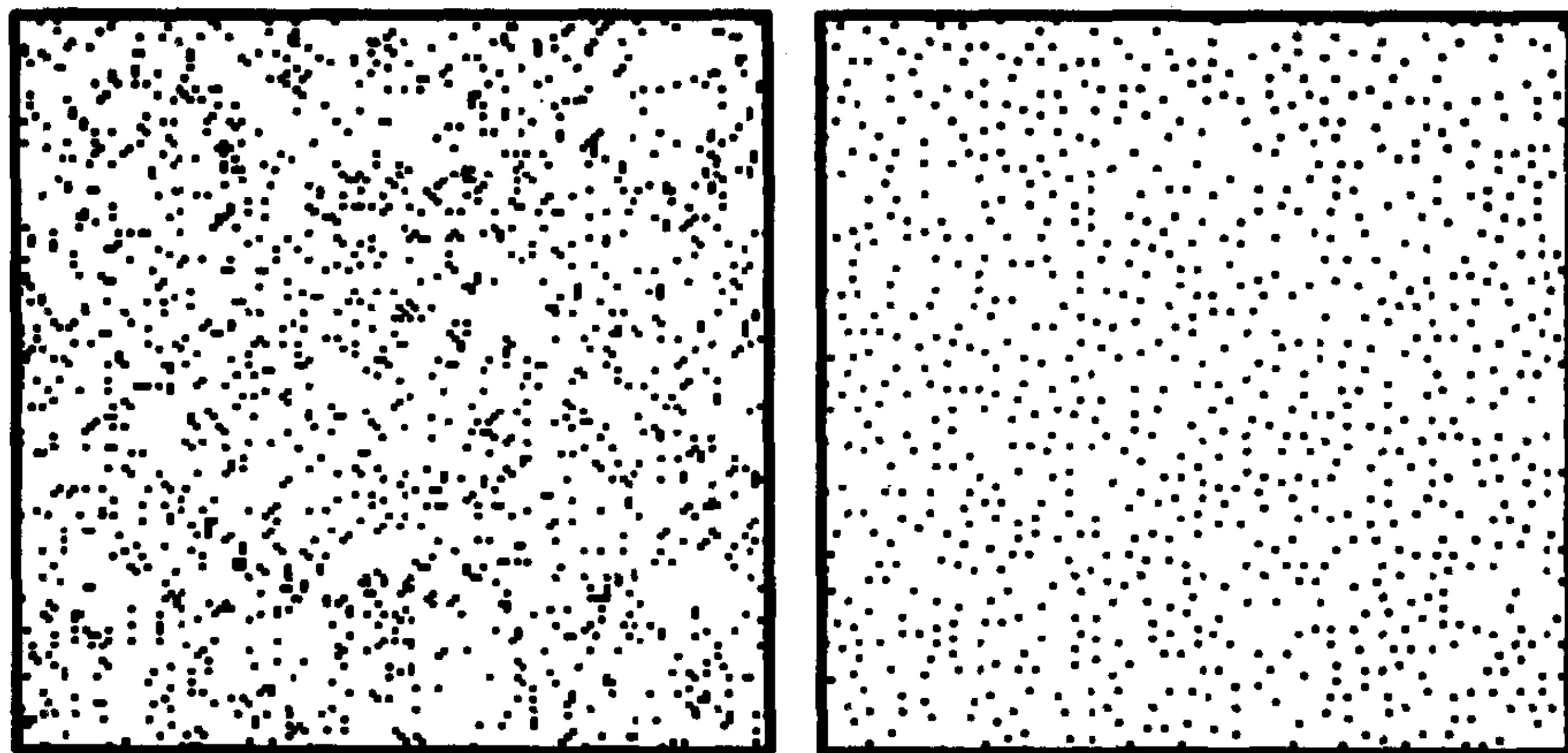


图 11-5 哪一个点阵是随机分布的
具体细节见“实验研究”中的讨论。

Avivi 和 Feldman(1980)回顾了植物中端粒的末端-末端附着,而且还提到对酿酒酵母(Ramirez & Miller 1962)和脉孢菌(*Neurospora crassa*)(Namboodiri & Lowry 1967)的细胞学研究。在这些真菌的有丝分裂过程中,吉姆萨或地衣红染色的染色体呈现出由深染体构成的两条平行带,且由明显的淡染色区缔合在一起。每条带代表一组单倍染色体中的一条。这些资料作为进一步的证据证实了末端-末端附着,但没有理由相信这种现象与 Wagenaar 和其他人所描述的高等植物中的附着现象相同,因为在真菌中染色体链在后期最明显,而植物端粒间的相互作用在此期或此期前就已消失了(Stack & Clarke 1973)。尽管如此,在酿酒酵母和裂殖酵母中,仍有一些端粒聚集的迹象,但不像上面提到的那样具有精确的末端-末端链式构型。在裂殖酵母中采用亚端粒探针进行的 FISH 实验已被用来考察分裂细胞中端粒的行为。尽管所用的探针仅仅覆盖了基因组的一小部分区域,并相当模糊,但单倍体和二倍体细胞中, G_2 期核内比中期细胞内连续检测到的信号更少。在酿酒酵母中,RAP1 抗体染色(Klein et al. 1992)和端粒直接原位杂交(A. F. Dernburg et al. 未发表)导致了在间期细胞中检测到的信号比端粒数目更少,这被解释为端粒成簇聚集在一起。在锥虫端粒原位杂交中,不论其亚核定位如何,端粒均表现为聚集而不是以链的形式存在。尽管昆虫和哺乳动物生育的生命阶段均可见到端粒的聚集现象,但后者更为明显(Chung et al. 1990)。

在昆虫,尽管对一种叫做 *Chrysomphalus ficus* 的蚧虫(Hughes-Schrader 1957)进行的细胞学研究大部分与精母细胞有关,但据报道其染色体链式构型存在于昆虫体细胞前期核(胚胎的)中。从海地果蝇和黑腹果蝇中得到的实验证据也提出了端粒-端粒缔合的问题。在海地果蝇的唾液腺多线染色体压片中,经常可以看到纤维状的末端与末端附着,并

表现为染色体臂间优势结合类型(Berendes & Meyer 1968)。用蛋白酶处理样本,不会使上述结构消失,因此认为在纤维中有 DNA 成分分布。在黑腹果蝇唾液腺染色体中,端粒并不融合成染色中心,但经常可观察到末端成对或成群连接的纤维。且某些多线核可以与端粒特异性的探针进行原位杂交(Rubin 1978),从而再次提示缔合纤维含有 DNA。应该注意的是在这些细胞核内所有的着丝粒异染色质融合成染色中心可能是多线细胞的独有特征。在二倍体果蝇细胞中,也许不会发生这种现象,因此,非同源染色体端粒的异染色质间的相互作用可能也是特化的多线状态的结果。

在果蝇胚胎二倍体核中,末端-末端缔合发生在晚前期核中。然而这仅限于同源染色体间的相互作用(Hiraoka et al. 1990),且没有证据表明染色体是连续的链式结构。在胚胎间期核中,用探针与染色体末端的邻近位点进行杂交,在两个同源染色体上可同时出现杂交信号,表明在整个细胞周期中端粒并非维持稳定的附着状态。在更晚期的发育阶段,人们认为二倍体核内同源染色体紧紧地缔合地一起,正如细胞学和遗传学所证实的那样(Metz 1916; Tartof & Henikoff 1991; A. Dernburg 未发表)。这也提出一个问题,即贯穿染色体全长的同源结合始于何处。端粒不可能是果蝇体细胞同源配对必需的起始点,因为同源配对可以于某一发育阶段在近侧位点如组蛋白基因簇处检测到,但此时同一染色体臂的更远末端梢序列还未配对(Hiraoka et al. 1993; W. Marshall et al 未发表)。

哺乳动物细胞中端粒-端粒缔合的迹象比昆虫和植物更少,更富有争议。然而据报道,在小鼠的细胞核中用简单序列端粒重复序列探针检测的端粒数量约为预期数量的一半(Vourc'h et al. 1993)。这可能是由于检测效率低于 100% 或端粒配对所引起的。人类的某些疾病可以导致染色体间末端-末端融合,从而形成环状染色体或双着丝粒线性染色体(Cooke 本书; de Lange 本书)。在一个患有 Thiberge Weissenbach 综合症的病人中,已报道多条染色体融合成一个环(Dutrillaux et al. 1978)。而且分子细胞学证据表明正常的人类 2 号染色体来源于两条古猿染色体的末端融合(Ijdo et al. 1991)。这些融合事件是否由正常的间期缔合引起还尚未得到证实。

端粒为何彼此缔合,怎样缔合?

上面已经讨论了与可能导致端粒-端粒缔合的机制有关的许多证据(Blackburn & Szostak 1984; Gilson et al. 1993a)。对端粒与核膜的相互作用来说,体外所观察到的端粒 DNA 的某些不寻常的行为,如形成非 Watson-Crick 结构的能力,也许在染色体末端对与对之间、组与组之间的相互作用中发挥作用。同样,端粒结合蛋白也可能被涉及到,但迄今为止还没有证据说明在体内哪些蛋白对这些作用是重要的。

Dancis 和 Holmquist(1979)回顾了许多说明端粒末端与末端缔合的资料,并提出了一个模型来解释发生的原因。线性染色体需要一种复制方式,即在没有丢失末端引物长度 DNA 片段的情况下进行复制。通过在一个闭合环中缔合,线性真核生物染色体可以以一种与原核生物相似的方式来解决线性染色体复制的难题。如果染色体在复制期形成环式构型,则可以防止问题的发生(理论上)。这当然是一个令人感兴趣的模型,然而最近的证据证实了端粒酶的存在及作用,从而产生了另外一种观点,即大多数的真核生物以不同的方式来解决线性染色体复制难题(Greider 本书)。

其他研究者提出,在有丝分裂细胞中所观察到的染色体间的末端附着,可能与减数分

裂中同源染色体的配对联系有关(Wagenaar 1969; Ashley & Wagenaar 1974; Ashley 1979)。最近, Sen 和 Gilbert(1988)对端粒序列在体外形成 G 四集体结构的能力提出了一个相似的功能。一个相关的问题是,在体细胞内已观察到同源和非同源端粒间的结合,但难点在于这样的排列方式如何有助于识别和同源寻找尚不清楚。进一步来说,有可能减数分裂核具有独特的端粒组构,并且在体细胞中(非生殖细胞)检测到的端粒缔合可能与减数分裂中同源染色体的配对过程没有密切关系(见下文)。

有迹象表明,即使在间期核观察到端粒的极化和边缘定位,端粒的定位也可能是在其他核结构(如核仁组织区)的空间位置确定之后发生的。在蚕豆和豌豆的根尖细胞核内可见到大部分端粒位于边缘,1/3 的信号与核仁有关(Rawlins et al. 1991)。另外,在亚核定位方面,很可能着丝粒区比端粒更加明显。Vourc'h 等(1993)对含有大部分近端着丝粒的小鼠淋巴细胞核的端粒定位情况进行了分类,并发现这些资料的解释是具有两个分开的端粒池,一个与着丝粒的行为相似,另一个(假定的远端端粒)具有独特的分布类型。对于这个结果的最保守的解释是靠近着丝粒的端粒遵循着丝粒的分布类型,但也可能由于靠近着丝粒的染色体端粒的出现改变了两个构件在核内的定位。

至少在某些生物体的减数分裂过程中,着丝粒与端粒具有相反的分布特征是真实的。在减数分裂前期,可以观察到端粒紧密地定位并聚集在核膜上,而着丝粒则相对松散地排列。在同源寻找时或前期 I 的联会过程中上述差异可能反映了染色体末端功能性地附着在细胞骨架成分(最有可能是微管)(见下文)。在有丝分裂细胞中,端粒不大可能具有这样的作用,在这些细胞中,在胞核内接近纺锤体极的一侧聚集的是着丝粒而不是端粒(Funabiki et al. 1993)。

减数分裂端粒组构

大量的细胞学研究结果表明减数分裂过程中端粒的定位和行为与在体细胞中所观察的不同。在本节,我们搜集了现存的有关减数分裂端粒组构的资料。减数分裂端粒的细胞学资料通常并非出现在端粒组构的研究中,而光学和电子显微镜研究所得到的相关资料则很多。

减数分裂端粒行为的典型特征可以在第一次减数分裂的前期(前期 I)观察到。此时大部分染色体末端附着于核膜的一个小区域。这种端粒的聚集比在体细胞中所看到的大,甚至比那些上文所谈到的具有清楚 Rabl 构型的结构更加明显。这种特殊的染色体末端构型被称为“花束排列”(Digby 1919),这种构型的描述可以追溯到近一个世纪以前的光学显微镜研究(Farmer & Moore 1905)。

下面谈到的是减数分裂端粒的动力学行为,即在前期 I 阶段具有一种渐进功能,表现出戏剧性的重排。一系列的减数分裂基本过程,包括同源寻找、识别、联会、重组及联会复合体的形成,也在高度特异化的前期 I 出现(John 1990; Loidl 1990; Rasmussen & Holm 1980)。为了弄清端粒行为如何与其他减数分裂过程产生功能上的联系,必须精确地确定在细胞学上所观察到的各个事件的发生时间。因此,我们将重点放在有助于说明花束形成的确切时间的研究上。

图 11-6 表示的是花束期与前期 I 各亚期的时间关系,并介绍了一些本文所使用的名

词。前期 I 比体细胞的前期明显延长,经常持续几天(John 1990)。根据染色体纤维的形态学,它被分为 5 个独立的时期。染色体纤维形态学反映了同源染色体配对或联会的顺序步骤,随后是联会消失,最终导致中期 I 以及发生在后期 I 的分离。染色体配对首先在偶线期被检测到,该期包括所有的具有中度联会的核。当联会完成时,核处于粗线期,并且同源染色体通过联会复合体(SC)沿其全长缔合在一起(von Wettstein et al. 1984)。经常出现的细胞质着丝粒(见图 11-6)的位置仅在偶线期和粗线期标出,以表明着丝粒出现在花束基部附近。

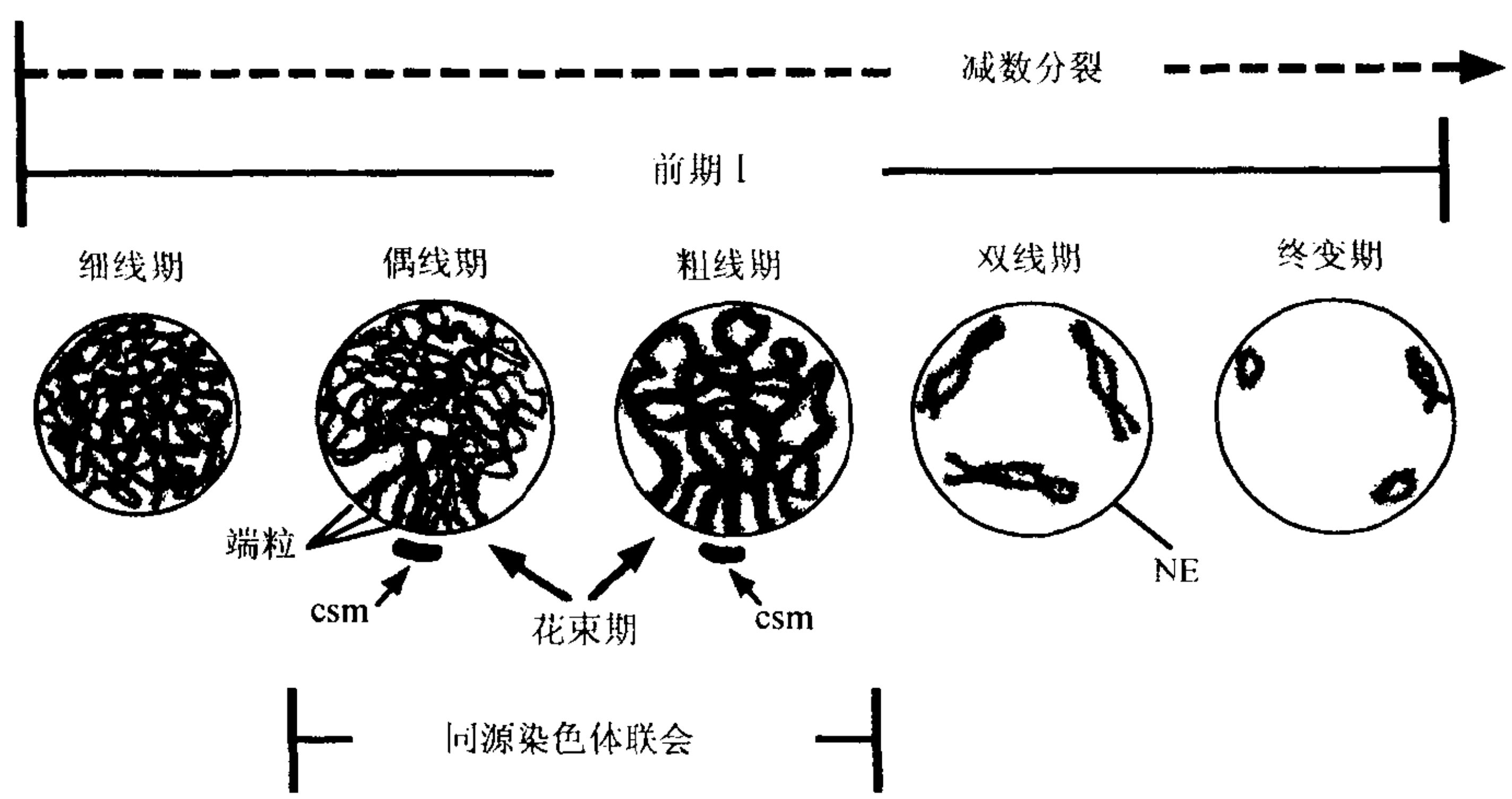


图 11-6 减数分裂前期 I 的花束期

具有代表性的真核生物中早期减数分裂 I 的进展如图所示,前期 I 可分为 5 个亚期(核上所示):细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期(John 1990)。偶线期核和粗线期核呈“花束”排列。花束基部(大箭头)包含了染色体末端(偶线期核的端粒)与核膜(NE)的接触区域。着丝粒与花束基部的相对位置被标出(csm)。染色体联会(同源染色体联会)发生的持续时间在底部标出。

在端粒聚集成簇的时候,有迹象表明它们与核膜紧密结合。超微结构分析表明在减数分裂过程中,染色体具有独特的轴状结构,包括轴心、侧生组分以及最终的完整联会复合体。很明显这些结构以其末端附着在核膜上,而且花束的底部位于胞质着丝粒附近(Schreiner & Schreiner 1905b; Moens 1969,1974; Loidl 1990)。根据染色体末端与细胞骨架的相互作用对附着的本质进行了探讨。

最近,从分子生物学和荧光显微镜的研究中得到的结果重新引起了人们对减数分裂机制的兴趣,且减数分裂中端粒组构的作用愈加明显(Padmore et al. 1991; Hawley & Arbel 1993; Kohli & Bahler 1994; Weiner & Kleckner 1994; Chikashige et al. 1994; Loidl et al. 1994; Scherthan et al. 1994)。因此也考虑对花束排列促进减数分裂的机制进行研究。

花束期

极化核期的研究历史

20 世纪初,(减数分裂的)“极化核期”一词是指我们现在所说的减数分裂的花束期

(见图 11-6)。此处所引用的极化核期来源于早期减数分裂文献,不同于我们所使用的有关染色体 Rabl 定向的“极化核”概念(体细胞部分,本章)。

20 世纪早期的清晰照片证实了前期 I 染色体末端的高度极化排列的存在(Farmer & Moore 1905;Schreiner & Schreiner 1905a,1905b;Grégoire 1907;Digby 1919;Gelei 1921;Janssens 1924)。极化核期似乎在短时间内与减数分裂染色体联会一致,这也引起了早期细胞学家的注意。有关这个早期文献的更加完整的历史性展望和回顾出现在由 Sharp (1921)、Wilson(1925)和 Darlington(1937)编写的教材的减数分裂一章中。从此,花束期一词专门用来指前期 I 的核构型,此时端粒明显地在核边缘聚集成簇,无论是否能观察到染色体的其他部分。清楚表现花束排列的例子是在蝶螈精母细胞相差显微镜研究中发现的(Kezer et al. 1989)。与之相反,膨贝酵母(*S. pombe*)(Chikashige et al. 1994)、黑麦(Thomas & Kaltsikes 1976)和玉米(Gillies 1975;Chang & Neuffer 1989)中的端粒则在近核膜处成簇存在,而末端染色体片段的特征性极化不明显。

在通过光学显微镜研究来确定花束排列的确切时间时,很明显会出现许多困难。其中很大一部分是因为缺乏用以区别前期 I 各亚期细胞质或细胞核的独立的发育标记。另外,亚期的精确判定经常很复杂,这是由于一个亚期到下一个亚期的变化是细微的,而且常规实验技术如酸和乙醇固定及压片等可导致细胞学细节的丢失。尽管有这些限制,但还是清楚地证实了偶线期短暂重叠的花束期,只是其准确的起始和终止点尚未被很好地确定。

应用系列电子显微镜切片进行三维重建

前期 I 核内端粒动力学重排可以在对减数分裂核进行准确分期的实验中得到清楚地说明。减数分裂染色体的电镜分析提供了有关端粒间的空间排布的信息,这些端粒可以通过它们在 SC 末端的位置来鉴别(Moens & Pearlman 1990)。SC 是联系同源染色体侧生组分结构(von Wettstein et al. 1984)。侧生组分与其前体、轴心在细线期出现,并在偶线期开始纵贯染色体的全长(Holm 1977)。当通过系列切片方法进行完全的三维重建时,可以清楚地识别核的减数分裂期,而且正由于此,这些研究为端粒行为的阶段依赖关系提供了最准确信息。

Moens(1969)首先将该方法应用于飞蝗(*Locusta migratoria*)的精母细胞研究,可见其染色体末端在核膜附着并在偶线期紧密地聚集在一起。从此,大量相似的研究证实了这种末端附着的显著阶段特异性重排的最初结论,如表 11-1。在这些研究基础上,聚集形成的可能时间被限定于细线期到偶线期的过渡时期(Moens 1969;Rasmussen & Holm 1978)。在玉米中该过渡期被称为前偶线期。三维光学显微镜显示,末端异染色体结节特异性地重新定位于核边缘(Dawe et al. 1994)。在该研究中,仔细的样本固定和制片与高分辨显微镜结合,使精确分期成为可能。

表 11-1 三维电子显微镜重建基础上的减数分裂端粒的阶段特异性聚集

组织	性别	阶段	参考文献
脊椎动物			
人, <i>Homo sapiens</i> (human)	M	eP	Holm & Rasmussen (1978)
	M	L/Z,eZ,IZ,eP	Rasmussen & Holm (1978)

组织	性别	阶段	参考文献
	F	mZ	Bojko(1983)
昆虫			
蝗虫: <i>Locusta migratoria</i> (locust)	M	L/Z, P	Moens(1969)
	M	eP	Moens(1973)
蚱蜢: <i>Brachystola magna</i> (grasshopper)	M	ePR	Church(1976)
蚕: <i>Bombyx mori</i> (silkworm)	F	eZ, mZ, lZ,	Rasmussen(1976)
	F	lZ, mP	Rasmussen & Holm(1979)
	M	eZ, mZ, lZ, eP	Holm & Rasmussen(1980)
	M, F	lZ, mP	Rasmussen & Holm(1982)
植物			
玉米: <i>Zea mays</i> (maize)	M	L, Z	Gillies(1975)
百合: <i>Lilium longiflorum</i> (lily)	M	eZ	Holm(1977)
小麦: <i>Triticum aestivum</i> (wheat)	M	lZ	Hobolth(1981)
黑麦: <i>Secale cereale</i> (rye)	M	Z, P	Abirached-Darmency et al. (1983)

注:大写字母表示前期 I 各期:L,粗线期;Z,偶线期;L/Z,粗-偶过渡期;P,双线期;PR,前期。小写字母表示描述性前缀:e. 早期;m. 中期;l. 晚期。

花束期在如此多的不同物种中出现说明了减数分裂的高度保守特征。然而,也有些重要的例外现象(Darlington 1937)。在已经经过 EM 水平分析的大量生物体中,各关键时期尚未观察到。例如,据报道在大多物种中缺乏减数分裂花束排列,但这样的观察仅限粗线期核(Lu 1967; Moens & Perkins 1969; Gillies 1972; Byers & Goestch 1975; Carpenter 1975; Goldstein & Slaton 1982; Moens & Ashton 1985)。因此,我们不能排除这些物种中花束期的存在,因为在其粗线期核的较早阶段,经常缺乏花束排列(Rasmussen 1976; Rasmussen & Holm 1978; Holm & Rasmussen 1980)。然而粪壳菌(*Sordaria macrospora*)细线期和偶线期的三维重建表明,SC 的末端附着于核膜,但并非明显地局限于核膜的一个小区,而这一点是花束排列的典型特征(Zickler 1977)。因此成簇可能依赖于染色体末端的附着,但也许不是不可避免的结果。雌性果蝇可能全部缺乏这样的减数分裂末端染色体的附着(Carpenter 1975)。有趣的是这些生物体缺乏简单的端粒重复序列(Biessmann & Mason 1994a, 1994b; Pardue 本书)。

在已知发生花束期的全部生物体中,花束期总是见于偶线期。这也许暗示了花束排列

与联会（作为同源染色体沿全长结合在一起的最终配对步骤）间的结构/功能关系。然而，在大多数描述性分析中尚未解答的问题是偶线期前的端粒排列。最近，已经可以在低倍镜下观察这些时期的端粒行为。

减数分裂端粒的三维 FISH

现在已经可以在光镜下应用 DNA 原位杂交技术识别端粒(Trask et al. 1993; Kohli 1994; Scherthan & Gremer 1994)。这种方法的优点是，与上述的三维 EM 方法相反，该法不只是局限于在 SC 部分或完全出现时的染色体研究。这使得我们可以应用光学扫描和宽视野显微镜来检测减数分裂任意时期的端粒分布(H. W. Bass et al. 未发表)。这些实验是了解同源染色体配对机制的一部分(Dawe et al. 1994)。该研究应用玉米精母细胞（进行正常的交叉减数分裂）产生了奇异的细胞学样本，并以大量减数分裂突变体以及一定的染色体重排系的形式提供了遗传分析方法(Carlson 1988; Freeling & Walbot 1994)。

与染色质和核的界限有关的端粒阶段特异性重排如图 11-7 所示，染色质和核的界限

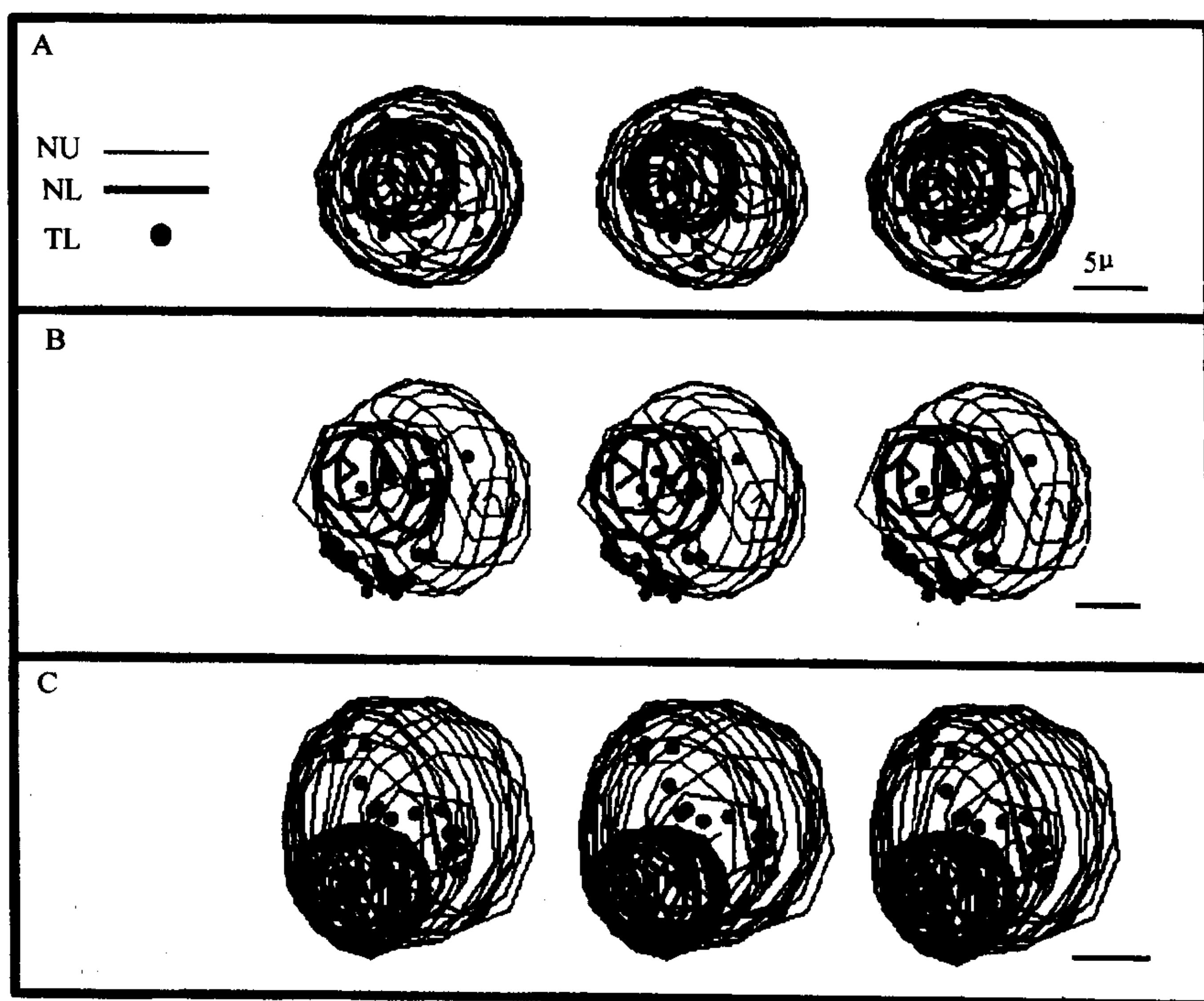


图 11-7 减数分裂过程中端粒重排的立体配对

减数分裂细胞用甲醛固定，固定在丙烯酰胺(Urata et al. 1995)，且用 FITC 标记的端粒特异性寡聚核苷酸探针(5'CCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAA3')进行 DNA 杂交。在用 DAPI 对 DNA 进行对比染色的条件下，每个光学侧面(0.2μmz-轴)有两个图像(DAPI 和 FITC)，构成三维数字化资料。用在 UCSF 上建立的硬件和软件进行收集、处理和模式化(Hiraoka et al. 1991; Chen et al. 1995)。端粒信号(TL, 点)的位置，核边界(NU, 细线)和核仁边界(NL, 粗线)如图所示。三维模型图像排列的立体配对分别代表了从早粗线期(A)、早偶线期(B)、早双线期(C)核中所获得的资料，3-D FISH 的立体配对观察结果如图所示。图中黑线长度代表 5μ。

可以应用 DAPI 染色在核图片中加以区别。端粒在细线期分布于由染色质占据的整个空间(TL,A),在偶线期则聚集并位于核边缘(B),在早粗线期开始散布于核边缘(C)。在偶线期和早粗线期的端粒构型(B和C)预示着花束排列。然而细线期的端粒除了被核仁占据的空间外,均匀地分布于整个核内。对位于细线期和减数分裂前间期的其他核也进行了类似的分析并证实图 11-7A 的模型是具有代表性的。细线期核中端粒位置的配对距离分布表现出它与球形内的随机点分布具有显著的相似性(H. W. Bass 未发表)。这些观察结果说明,可以应用 FISH 及光学断层显微术对端粒的动力学阶段依赖性重排在三维水平进行定性研究。

减数分裂前期端粒成簇的重新形成

直到最近,对前期 I 端粒观察仅限于由晚细线期开始的 SC 能被检测到的阶段。如果缺乏有关早些阶段的信息,那么对端粒聚集的合理解释是它起源于有丝分裂前的染色体重排,即起源于 Rabl 定向(Fussell 1987)。然而,应用三维 DNA 原位杂交,我们已测定到在早细线期,端粒不是局限于核的一侧半球,而是分布于染色体占据的整个核内(见图 11-7A)。在早前期端粒不表现出显著聚集或局限于核膜,类似的结果通过三维光镜检查(Dawe et al. 1994)和 DNA 原位杂交分析来自人类、小鼠、中国黄鹿的减数分裂细胞(meioocyte)的核切片,得到了相同的结果,即在早前期端粒不表现出显著聚集或局限于核模处(H. Scherthan 个人通讯)。从这些端粒分布研究得到的越来越多的证据证明花束期端粒的聚集不是以前的 Rabl 定向作用的结果。花束簇必须在细线期和偶线期间重新形成,并且由此可以与 Rabl 定向和体细胞核端粒的末端相互作用相区别(Wagenaar 1969; Ashley & Wagenaar 1972,1974; Ashley 1979)。花束形成的动力学特征预示了发生在减数分裂前期的主动过程(Gelei 1921; Kezer et al. 1989)。

在小鼠精母细胞中,已观察到的端粒构型可能代表了花束形成过程中的一个中间步骤。通过 FISH 观察到的端粒定位于核边缘,但似乎不表现出聚集现象(Scherthan & Cremer 1994)。如果边缘定位或核膜附着总是早于成簇的花束排列,这可能预示着机制上彼此独立的两种连续运动导致了在偶线期观察到的端粒聚集。首先,在中到晚细线期端粒向核膜移动,然后,在细线期向偶线期的过渡阶段,膜结合端粒沿核膜平面向核膜的某个小区域即花束基部移动。这种两步模式预示了在许多物种中可以发现位于边缘的,但未聚集的端粒的中间排列形式,并且这种排列预示着第一步的结束。然后,核膜结合染色体末端集结,构成第二步骤,且标志着花束期的开始。第二步骤对花束期形成的作用已被充分证实,这首先是 Gelei 提出的,而后在超微结构水平得到了证实(Rasmussen & Holm 1978; Bojko 1983)。

减数分裂染色体末端的核膜附着

减数分裂的电镜分析对减数分裂染色体的结构、定位及其组成产生了新的重要认识。在电镜下首先看到的联会复合体是粗线期联会染色体的一个连续的轴状结构(Fawcett 1956; Moses 1956; Moses 1968)。一般可以看到,联会复合体以其末端与核膜的内膜缔合(Moses 1968; von Wettstein 1984)。这些染色体的末端与核膜的附着对减数分裂细胞来说是独特的,并且可能包括了特殊结构,在电镜下显示为侧生组分末端的局部加厚,或称

联会复合体(Solari 1970)(见表 11-1)。如果对它们进行计数,偶线期或粗线期染色体末端附着的比例范围一般在 80%~100%之间(见表 11-1)。

减数分裂细胞中端粒与核膜的结合对实验中所受的作用力有抵抗作用(Hiraoka 1952 c)。Hiraoka 将花粉和孢子母细胞(减数分裂前期 I)离心,发现减数分裂染色体在核内可以移位。他用不同渗透压的溶液处理减数分裂细胞,观察到核内可逆的染色体收缩。然而在这两个实验中,染色体依然附着于核边缘,并且这些附着局限于花束的基部,就像不受影响的减数分裂细胞一样(Hiraoka 1952a, 1952b)。小部分核膜保持对膜上散布的减数分裂染色体末端的束缚,这一倾向也暗示着染色体末端与核边缘某种成分的牢固附着(Comings & Okada 1970; Solari 1972; Counce & Meyer 1973; Moens et al. 1989; Klein et al. 1992)。这些附着是否依赖端粒重复序列、特殊的亚末端序列、或一些减数分裂染色体末端的独特结构尚不知晓。

端粒/细胞骨架相互作用的证据

在前期 I,端粒局限于核膜上的较小区域预示了一个主动过程,但对其本质尚缺乏了解。然而各种各样的偶然迹象表明,花束期可能包括了染色体末端与细胞骨架的相互作用。很长时间就已注意到中心体与花束基部紧紧地并在一起(见图 11-6)。这种接近在一个世纪前就已有报道(Schreiner & Schreiner 1905b)。最近在裂殖酵母有丝分裂的细胞中已经得到了证实(Chikashige et al. 1994),且反映了细胞和核结构的一种时期特异性结构。尽管减数分裂染色体与中心体联系很少报道,但在脉孢菌属(*Neurospora*)减数分裂细胞的电镜观察时就已注意到了染色体末端与中心体的纤维附着(Bojko 1990)。在中期 I 之前,中心体复制,两条子中心体向未来的纺锤体极移动。在一些物种中,两个部分分离的中心体与染色体末端核心保持缔合,导致两个不完全花束的出现(Hughes-Schrader 1943; Moens 1974)。总而言之,这些观察使人们得出了这样的结论:花束期染色体末端以一种未确定的方式与中心体缔合。在既无中心粒又无纺锤体极的植物中,人们也许希望在花束的近基部发现一个微管组织中心,但这一点尚未得到证实。

另一些有关细胞骨架影响减数分裂染色体行为的证据来源于对微管分解试剂的研究。秋水仙素或秋水仙碱的处理对减数分裂染色体运动、联会和交换率都具有不利影响(Rickards 1975; Loidl 1990)。在一项研究中,具有等臂染色体的一个小麦品系被用于区别同源配对的两个步骤(Driscoll & Darvey 1970)。一条等臂染色体具有两条与一个普通着丝粒缔合的同源染色体臂,从而使之自我配对和重组,并导致可见交叉的形成。秋水仙素处理可以降低除等臂染色体之外的所有染色体的交叉频率。从这些资料中作者推论,秋水仙素防止配对过程中两个独立步骤的第一步的发生,即同源部分的空间接近,从而降低了交叉的形成。他们指出,导致同源空间接近的过程需要微管的参与。另一个研究描述了秋水仙素处理对早前期培养百合减数分裂细胞的生化影响(Hotta & Shepard 1973)。其结果表明,秋水仙素对活细胞的减数分裂染色体行为的影响,部分是通过改变核膜的性质产生的。两个观察结果支持了这样的观点:①减数分裂核膜组分可以在体外用³H-秋水仙素标记;②与核膜形成有关的 DNA 结合活性可以通过秋水仙素对减数分裂细胞的预处理而大量降低(Hotta & Stern 1971)。尽管核膜对联会的直接作用还有待观察,但这些及其他相似的研究均证实了花束形成的生化分析可能性(Stern & Hotta 1974; Loidl 1990)。

对微管分解性药物对染色体行为的影响的解释需要谨慎。在研究药物中经常如此。由于缺乏药物处理破坏或消除微管排列的证据,因此很难给这些研究做出清楚的解释。使问题进一步复杂的是,减数分裂前期发生许多其他的核和细胞质结构的特殊移动。包括核孔、异染色质、高尔基体、线粒体、质体和脂原体在内的许多核结构和细胞结构的重新排列出现在多种生物体花束期的起始阶段(Marengo 1949;Hiraoka 1952c;Dover 1972;Fabbri & Bonzi 1975;Church 1976;Holm 1977;Hiraoka & Fuchikawa 1993;Dawe et al. 1994)。微管解聚药物的破坏作用尚未研究。尽管特异的细胞骨架依赖性作用力在花束排列的形成或维持上是重要的,但微管药物对减数分裂染色体行为的影响可能是间接的。

减数分裂端粒与细胞骨架相互作用的进一步证据来源于 Chikashige 等(1994)的著名论证。他们发现,裂殖酵母的减数分裂前期核是高度游动性的,这解释了特征性的“长马尾型”核在此期出现的原因。在活细胞的慢速摄影照片中,核的一端被拖着沿细胞的长度前后运动。作者应用 DNA 原位杂交和免疫细胞化学技术分别证实了端粒和纺锤极体(中心体)的位置位于马尾核的尖端或末端。在试图理解前期 I 期间端粒聚集与活性染色体或核运动之间的机械性联系的问题上,这个研究取得了重要的新进展。由于裂殖酵母缺乏联会复合体(Bahler et al. 1993),而且核非常小,因此很难精确地确定端粒与核膜的相对位置。探讨裂殖酵母中的运动行为对影响微管、微丝、转录或蛋白质合成的试剂的敏感性是十分令人感兴趣的。这种方法可以更好地说明端粒对前期 I 染色体行为的作用。

联会在染色体末端的优先起始

对减数分裂同源配对进行的细胞学、遗传学和电镜分析表明,联会在染色体末端附近频繁起始(Tabata 1962,1963;Kasha & Burnham 1965;Burnham et al. 1972)。在这些研究的基础上,人们认为侧生组分末端与核膜的附着有助于高效而精确的同源染色体联会(Moens et al. 1989)。然而,这种认识很少得到证实,并在某种程度上,由于缺乏端粒的环型染色体能够进行重组和联会而被削弱(Maguire 1984)。

一个经常被引用的端粒序列参与减数分裂联会的模型认为,在减数分裂期,同源染色体的端粒重复序列借助一个平行的 G-4/DNA 结构而融合(Sen & Gilbert 1988)。G-4 结构是通过端粒简单重复序列的相互作用形成的,并可以在生理盐水浓度条件下在体外观察到(Henderson 本书)。根据此模型,如果同源端粒融合,那么通过 DNA 原位杂交实现的缺失应该仅能检测到一个信号,然而在联会的减数分裂染色体末端一般可观察到两个杂交点(Moens & Pearlman 1990;H. W. Bass 未发表)。当同源的侧生组分接近到 δ . 3 μ m 距离时就会出现明显的联会作用。在此时联会复合体开始形成(Moens 1969;von wettshein et al. 1984)。详细的电镜研究结果表明,当联会在同源染色体近末端起始时,在偶线期相应的侧生组分/核膜附着点间的距离大于最终在粗线期所见的距离(Moens 1969)。因此,染色体末端的聚集,即所谓的花束期,可以促进染色体末端联会的起始。然而在偶线期和粗线期核的细胞学样本中,端粒序列的持续融合(通过内部同源 G-4 序列,Sen & Gilbert 1988)并不能被维持,说明在同源染色体联会中,端粒重复序列的融合如果有作用的话,也不可能是主要作用。

为什么联会在染色体末端优先起始呢?一种解释是,在核内较小的区域里,花束排列通过使同源亚末端区域处于平行排列而促进染色体配对(Berrios & Fernandez-Donoso

1990)。为了理解端粒聚集在减数分裂配对和联会中的作用,我们需要找出一些方法来准确地检测配对和联会的进程,该现象的机制尚未阐述。在偶线期和粗线期很难观察到联会失败。但交叉频率的降低、标准二价体排列的偏离或配子生活力的降低等经常作为配对错误而被报道。而且,我们不能通过实验干扰来特异性地中断花束的形成,这限制了我们对联会起始时花束排列的相关作用的评估。没有明显证据证明花束排列是重要的,实际上减数分裂端粒聚集的任何作用,或者是无作用,都似乎说得通(Maguire 1984; Kleckner & Weiner 1993)。最后,端粒行为的细胞学研究可能与其他方法结合,以阐明同源配对和联会过程中端粒的作用。

评价原位杂交资料的实验研究

原位杂交的易行性可能会鼓励许多研究者去进行端粒分布的细胞学分析,因此有必要对评价这些资料的过程中所必须考虑的一些问题进行讨论。很多因素使利用三维原位杂交资料进行端粒定位分析变得更复杂。我们讨论了实验研究的三个不同侧面:光学显微镜的本质、光学镜资料分析的过程和显微镜标本本身。

光学显微镜作为理解端粒空间排布的工具

一类问题来源于显微镜的限制,甚至是最好的散焦信息移除技术(out-of-focus information-removal technique)的荧光显微镜,其 xy 平面与透镜光轴正交分辨率仅为 $0.2\mu\text{m}$ 左右(Bradbury 1989);在 z 方向其分辨率更差,仅为 $0.4\sim 0.6\mu\text{m}$ 。比分辨率临界距离更近的两个物体的映像会重合在一起。因此,如果从两个独立端粒发出的信号比 $0.2\mu\text{m}$ 更近时,则会重合在一起,但这并不意味着在分子水平的缔合。由于所研究的核在没有通过膨胀技术人工增大时直径仅有几微米,因此分辨率限制对于整个线性范围来说是很大的一部分。对于小核的生物体,如单倍体核直径仅为 $1.5\sim 2\mu\text{m}$ 的酿酒酵母,其意义将非常显著。

认识到已知球体的体积随着外壳与球心之间距离的立方增加而增加也是很关键的。这样,在核内已知信号的随机分布将会出现“边缘”现象,这是由于远离中心的地方比靠近中心的地方体积更大。球形核内随机分布的任意一点将落在核中心到边缘距离的 $4/5$ 的位置。这意味着在没有详尽的统计资料分析的前提下,在描述信号位于边缘时需要特别谨慎。在酵母核内,其直径仅有 $1.5\sim 2\mu\text{m}$,在至少 50%的情况下,随机分布的点会出现在核边缘(即在显微镜的 $0.2\mu\text{m}$ 分辨率的范围内)。因此,光学细胞学特别适合于较大的核。然而,应用遗传学和(或)生化方法来描述适合于功能研究的生物体细胞核是非常有意思的,而且这些标准在许多研究中并不能协同使用。尤其当描述酵母、果蝇、锥虫、拟南芥属和其他实验生物体的小核时,应当使用高品质的透镜并用共聚焦或计算机辅助方法来使每一个光学断层的散焦信息的作用最小,即使有最好的光学系统,还必须时刻注意透镜的分辨界限。

统计分析

在三维资料分析中,又一个使问题复杂化的部分是应用统计方法对端粒分布作出有

意义的描绘。人类的大脑在理解空间排布方面有时会被误导。为了说明这个问题,我们利用 Stephen Jay Gould 书中对有关问题的讨论来加以证明(Gould 1991)。图 11-5 为两个不同计算机产生的二维点分布,乍一看,右边的区域似乎更加“随机”,而左边的区域,眼睛在观察时倾向于注意到点的聚集,然而事实上这个区域也是随机分布状态。右边的点分布更均匀的原因是有一种被强加的非随机分布状态,因为每一个点的周围都有一个“抑制带”,也就是说,没有任何一点可以在一个已知点的邻近周围存在。人类将聚集成簇误解为非随机分布的这种倾向对端粒的杂交资料分析有影响,因此客观的统计方法具有明显的意义。

然而,对三维显微镜资料进行统计分析有许多难题。困难出现在对大小、形状不一的核的比较上。必须应用一些校正方法,以便能够对这些核进行共同分析。为了确定核极化是否一致,必须使用一些标记作为参考点,但在分离的核内这几乎是不可能的。因此最好在完整的细胞或组织内检查核。那么,有可能使用细胞成分,如中心体,作为参考。在完整的组织内,可以获得有关细胞周期和单个核发育状态的信息,从而使端粒组构的观察结果更有意义。例如在果蝇胚胎囊胚期,我们有机会在对大量细胞核进行比较的基础上得出结论(Hiraoka et al. 1993),所有这些核在细胞周期的同一点,并处于相同的发育状态(Chung et al. 1990)。

另一个具有挑战性的问题是一个显微镜样本细胞,这些细胞带有大量不同的,但又是非随机的端粒分布。集中所有的核进行统计分析也许会得出无序分布的结果。已被成功地用来克服这一问题的方法是用 DNA 成分对核进行分类,以使 G_1 、S 期和 G_2 核能够被分别检查(Vourc'h et al. 1993)。确实,已经表明,随着细胞周期的进行,端粒可以改变其在核内的分布。然而该技术要求将核制备成悬液,这会丢失有关其他细胞组分和组织极化的信息。一个可能的解决方法是应用多元统计方法来客观地确定是否有多个具体的核结构类型存在,但这需要比迄今为止已报道的有关核的数量以及核体积和杂交信号空间排布的数字化信息更好的资料。

样本选择和处理

在使用 FISH 技术考查端粒分布的过程中,所要考虑的第三类问题是样本的选择及其处理。通常选择细胞核来进行分析,其原因或者是由于它们代表在实验上容易控制的有趣的系统,或者是由于它们非常适合于进行显微镜细胞学分析。芽殖和裂殖酵母的遗传学分析相对简单而快速,正由于此,我们可以期待能够分离出影响核组构的突变体并加以研究(Funabiki et al. 1993)。裂殖酵母具有的另一个优点就是染色体数目较少,杂交类型相对简单,而单倍体芽殖酵母有 16 条染色体。相反,哺乳动物淋巴细胞核则具有细胞学的优势,因为其核呈球形且细胞较易培养,但不容易产生遗传突变体。由于我们对亚核定位在有丝分裂、转录和细胞生理学其他方面的作用知之甚少,因此对包括有丝分裂活性细胞、分化细胞和极化细胞在内的大量细胞类型的组构进行分析是非常重要的。

除了合适的生物体,还必须选择一套实验程序以使端粒序列的检测成为可能。在进行细胞学研究时,最好尽可能减少细胞的干扰程度。然而,无论通过 C 带还是原位杂交法检测特殊序列,都需要固定和化学处理以使染色质变性。原位杂交自产生以来的许多年里,仅应用于分离经低渗膨胀处理,再用酒精或酸固定在载玻片上的核或细胞。这个方法不适

用评价某段序列是位于核内还是位于核边缘,而且很难确定核极化是否存在。如上所述,在显微镜分析时保持核三维特征的方法更富有挑战性,但却能明显地确保对核组构的了解。原位杂交技术可以成功地应用全样载片甲醛固定组织,而不需要酶或强清洁剂的处理(Rawlins et al. 1991; Ferguson & Ward 1992; Vourc'h et al. 1993)。这样的程序已应用于一些果蝇组织和酿酒酵母细胞(A. F. Dernburg & J. W. Sedat 未发表),也许还可能用于多种(即使不是全部的)细胞类型。如果可能,应该用复合程序处理细胞,以确保不会因细胞处理产生人工假象(Chung et al. 1990; Hiraoka et al. 1993)。

结论及展望

我们至今仍处于单纯观察间期细胞端粒行为的阶段。尽管这是一项观察工作,但在大量的生物系统对端粒行为进行分类,弄清楚能够产生哪些观察结果,以及哪些结果依赖于所研究的生物体和细胞类型将是很重要的。用光学和电子显微镜研究原位杂交方法的时代的到来将促进这种研究。

端粒细胞学研究结果的某些差异可能是细胞和染色体动力学特征造成的。细胞学观察一般需要组织的固定和染色,从而对染色体结构进行快速观察。由于核组构的某些成分明显处于动态,因此很难通过对固定组织的观察来解释。需要发明一些方法以有助于在三维角度观察活细胞的端粒。由于可以将荧光标记功能蛋白导入活细胞,因此大量的端粒结合蛋白的鉴定也许会成为合适的研究工具(Wang & Taylor 1979; Wang & Hazelrigg 1994)。一旦清楚地证实了端粒行为,重要的就是寻找到影响端粒分布的条件,从而对依赖定位分布的端粒功能有所了解。

在体细胞内,端粒组构方面(如 Rabl 定向的普遍性)、潜在的核膜结合和从前期到末期的染色体末端与末端的连接等可以在大量物种中发现,然而这种排列的生物学意义仍旧难以理解。在用显微镜观察核组分的空间排布特征时必须给予注意。

在减数分裂细胞中,端粒是动态的,在偶线期聚集形成花束排列。这种独特的核排列很可能在功能上与同源配对和联会有关。鉴别有利于花束形成和维持的影响因素也十分有意义。为了检测端粒聚集在减数分裂进程中的关键作用,可以通过细胞学、生物化学和遗传学方法来探讨端粒、核膜以及微管组构中心的关系。

致谢

感谢 Harry Scherthan 提供未发表的资料;感谢 T. Ashley 和 K. Sperling 提供图片。感谢 Jeremy Minshull 和 Judith Berman 在体细胞部分、Peter Moens 和 Harry Scherthan 在减数分裂部分提出建议。Sedat 和 Cande 等实验室成员对手稿提出了建议并进行审校,Wallace Marshall 为图 11-5 编写程序,在此一并致谢。本研究得到了哈佛医学院(J. W. S & D. A. Agard)和国家卫生部 R01-GM-25101-16 和 R01-GM-31627-12(分别是 J. W. S 和 D. A. A.),国家卫生部 GM-485547(W. Z. C)和生命科学研究基金(H. W. B.)的能源博士后站的资助。

参考文献

- Abirached-Darmency, M., D. Zickler, and Y. Cauderon. 1983. Synaptonemal complex and recombination nodules in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* **88**: 299–306.
- Ashley, T. 1979. Specific end-to-end attachment of chromosomes in *Ornithogalum virens*. *J. Cell Sci.* **38**: 357–367.
- Ashley, T. and E. B. Wagenaar. 1972. End-to-end attachment of haploid chromosomes of *Ornithogalum virens*. *Can. J. Genet. Cytol.* **14**: 716–717.
- . 1974. Telomeric associations of gametic and somatic chromosomes in diploid and autotetraploid *Ornithogalum virens*. *Can. J. Genet. Cytol.* **16**: 61–76.
- Avivi, L. and M. Feldman. 1980. Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of plants. *Hum. Genet.* **55**: 281–295.
- Bahler, J., T. Wyler, J. Loidl, and J. Kohli. 1993. Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: A cytological analysis. *J. Cell Biol.* **121**: 241–256.
- Bělár, K. 1928. Die cytologischen Grundlagen der Vererbung. In *Handbuch der Vererbungs-wissenschaft* (ed. E. Baur and M. Hartmann), vol. 1. Gebr. Borntraeger, Berlin.
- Belmont, A.S., M.B. Braunkopf, J.W. Sedat, and D.A. Agard. 1989. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma* **98**: 129–143.
- Berendes, H.D. 1963. The salivary gland chromosomes of *Drosophila hydei* Sturtevant. *Chromosoma* **14**: 195–206.
- Berendes, H.D. and G.F. Meyer. 1968. A specific chromosome element, the telomere of *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosoma* **25**: 184–197.
- Berman, J., C.Y. Tachibana, and B.K. Tye. 1986. Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 3713–3717.
- Berrios, S. and R. Fernandez-Donoso. 1990. Nuclear architecture of human pachytene spermatocytes: Quantitative analysis of associations between nucleolar and XY bivalents. *Hum. Genet.* **86**: 103–116.
- Biessmann, H. and J.M. Mason. 1994a. Genetics and molecular biology of telomeres. *Adv. Genet.* **30**: 185–249.
- . 1994. Telomeric repeated sequences. *Chromosoma* **103**: 154–161.
- Billia, F. and U. de Boni. 1991. Localization of centromeric satellite and telomeric DNA sequences in dorsal root ganglion neurons, in vitro. *J. Cell Sci.* **100**: 219–226.
- Blackburn, E.H. and J.W. Szostak. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 163–94.
- Bojko, M. 1983. Human meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlsberg Res. Commun.* **48**: 457–483.
- . 1990. Synaptic adjustment of inversion loops in *Neurospora crassa*. *Genetics* **124**: 593–598.
- Boveri, T. 1909. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomen-individualität. *Arch. Zellforsch.* **3**: 181–268.
- Bradbury, S. 1989. *An introduction to the optical microscope*, revised ed. *Microsc. Handb.* **1**.
- Burnham, C.R., J.T. Stout, W.H. Weinheimer, R.V. Knowles, and R.L. Phillips. 1972. Chromosome pairing in maize. *Genetics* **71**: 111–125.
- Byers, B. and L. Goetsch. 1975. Electron microscopic observations on the meiotic karyotype of diploid and tetraploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 5056–5060.
- Carlson, W.R. 1988. The cytogenetics of corn. In *Corn and corn improvement* (ed. G F. Sprague and J.W. Dudley), pp. 259–344. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Carpenter, A.T.C. 1975. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females. I. Structure, arrangement, and temporal change of the synaptonemal complex in wild-type. *Chromosoma* **51**: 157–182.
- Chang, M.T. and M.G. Neuffer. 1989. Maize microsporogenesis. *Genome* **32**: 232–244.
- Chen, H., J.R. Swedlow, M.A. Grote, J.W. Sedat, and D.A. Agard. 1995. *Handbook of*

- biological confocal microscopy* (ed. J.B. Pawley). Plenum Press, New York. (In press.)
- Chikashige, Y., D.-Q. Ding, H. Funabiki, T. Haraguchi, S. Mashiko, M. Yanagida, and Y. Hiraoka. 1994. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* 264: 270-273.
- Chung, H.M., C. Shea, S. Fields, R.N. Taub, L.H. Van der Ploeg, and D.B. Tse. 1990. Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: Location of telomeres and mini-chromosomes. *EMBO J.* 9: 2611-2619.
- Church, K. 1976. Arrangement of chromosome ends and axial core formation during early meiotic prophase in the male grasshopper *Brachystola magna* by 3-D, E.M. reconstruction. *Chromosoma* 58: 365-378.
- Church, K. and P.B. Moens. 1976. Centromere behavior during interphase and meiotic prophase in *Allium fistulosum* from 3-D, E.M. reconstruction. *Chromosoma* 56: 249-263.
- Comings, D.E. and T.A. Okada. 1970. Mechanism of chromosome pairing during meiosis. *Nature* 227: 451-456.
- Comings, D.E., E. Avelino, T.A. Okada, and H.E. Wyandt. 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.* 77: 469-493.
- Counce, S.J. and G.F. Meyer. 1973. Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. *Chromosoma* 44: 231-253.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, and C. Zorn. 1982. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum. Genet.* 60: 46-56.
- Dancis, B.M. and G.P. Holmquist. 1979. Telomere replication and fusion in eukaryotes. *J. Theor. Biol.* 78: 211-224.
- Darlington, C.D. 1937. *Recent advances in cytology*, (second edition). Churchill, London.
- Davis, L.I. and G. Blobel. 1987. Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: Glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7552-7556.
- Dawe, R.K., J.W. Sedat, D.A. Agard, and W.Z. Cande. 1994. Meiotic chromosome pairing in maize is associated with a novel chromatin organization. *Cell* 76: 901-912.
- de Lange, T. 1992. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *Cell* 11: 717-724.
- Digby, L. 1919. On the archesporial and meiotic mitoses of *Osmunda*. *Ann. Bot.* 33: 135-172.
- Dover, G.A. 1972. The organization and polarity of pollen mother cells of *Triticum aestivum*. *J. Cell Sci.* 11: 699-711.
- Driscoll, C.J. and N.L. Darvey. 1970. Chromosome pairing: Effect of colchicine on an isochromosome. *Science* 169: 290-291.
- Dutrillaux, B., M.F. Croquette, E. Viegas-Pequignot, A. Aurias, J. Coget, J. Couturier, and J. Lejeune. 1978. Human somatic chromosome chains and rings. *Cytogen. and Cell Genet.* 20: 70-77.
- Fabbri, F. and L.M. Bonzi. 1975. Observations on nuclear pores of freeze-etched spore mother cells of *Psilotum nudum* (L.) Beauv. during early stages of meiotic prophase I. Preliminary report. *Caryologia* 28: 549-559.
- Fan, J.B., M. Rochet, C. Gaillardin, and C.L. Smith. 1992. Detection and characterization of a ring chromosome in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 20: 5943-5.
- Farmer, J.B. and J.E.S. Moore. 1905. On the meiotic phase (reduction divisions) in animals and plants. *Q. J. Microsc. Sci.* 192: 489-557.
- Fawcett, D.W. 1956. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 403-406.
- Ferguson, M.L.F. and D.C. Ward. 1992. Cell cycle dependent chromosomal movement in

- pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* **101**: 557–565.
- Foe, V.E. and B.M. Alberts. 1985. Reversible chromosome condensation induced in *Drosophila* embryos by anoxia: Visualization of interphase nuclear organization. *J. Cell Biol.* **100**: 1623–1636.
- Freeling, M. and V. Walbot. 1994. *The maize handbook*. Springer-Verlag, New York.
- Funabiki, H., I. Hagan, S. Uzawa, and M. Yanagida. 1993. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J. Cell Biol.* **121**: 961–976.
- Fussell, C.P. 1975. The position of interphase chromosomes and late replicating DNA in centromere and telomere regions of *Allium cepa* L. *Chromosoma* **50**: 201–210.
- . 1977. Telomere associations in interphase nuclei of *Allium cepa* demonstrated by C-banding. *Exp. Cell Res.* **110**: 111–117.
- . 1983. Telomere arrangement in differentiated interphase cells of *Allium cepa*: A function of chromosome arm lengths at anaphase-telophase. *Can. J. Genet. Cytol.* **25**: 478–486.
- . 1984. Interphase chromosome order: A proposal. *Genetica* **62**: 193–201.
- Fussell, C.P. 1987. The Rabl orientation: A prelude to synapsis. In *Cell biology: A series of monographs: Meiosis*. (ed. P.B. Moens), pp. 275–300. Academic Press, San Diego, California.
- . 1992. Rabl distribution of interphase and prophase telomeres in *Allium cepa* not altered by colchicine and/or ultracentrifugation. *Am. J. Bot.* **79**: 771–777.
- Gelei, J. 1921. Weitere Studien über die Oogenese des *Dendrocoelum lacteum*. II. Die Längskonjugation der Chromosomen. *Arch. Zellforsch.* **16**: 88–169.
- Gillies, C.B. 1972. Reconstruction of the *Neurospora crassa* pachytene karyotype from serial sections of synaptonemal complexes. *Chromosoma* **36**: 119–130.
- . 1975. An ultrastructural analysis of chromosomal pairing in maize. *Carlsberg Res. Commun.* **40**: 135–162.
- Gilson, E., T. Laroche, and S.M. Gasser. 1993a. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* **3**: 128–134.
- Goldstein, P. and D.E. Slaton. 1982. The synaptonemal complexes of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* **84**: 585–597.
- Gould, S.J., ed. 1991. Glow, big glowworm. In *Bully for brontosaurus: Reflections in natural history*, pp. 255–268. Norton, New York.
- Grégoire, V. 1907. La formation des gemini heterotypiques dans les végétaux. *La Cellule* **24**: 369–420.
- Hawley, R.S. and T. Arbel. 1993. Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* **72**: 301–303.
- Heitz, E. 1932. Die Herkunft der Chromozentren. *Planta* **28**: 571–636.
- Hiraoka, T. 1952a. Observational and experimental studies of meiosis with special reference to the bouquet stage. VIII. An experimental study on the cell and nuclear conditions in the bouquet stage. *Cytologia* **16**: 335–340.
- . 1952b. Observational and experimental studies of meiosis with special reference to the bouquet stage. X. Response of chromosomes in meiotic prophase to centrifugal force. *Bot. Mag. Tokyo* **65**: 102–108.
- . 1952c. Observational and experimental studies of meiosis with special reference to the bouquet stage. XIV. Some considerations on a probable mechanism of the bouquet formation. *Cytologia* **17**: 292–299.
- Hiraoka, T. and Y. Fuchikawa. 1993. An electron microscopic and morphometric analysis on the cell polarity in the synaptic stage of meiosis. *Cytologia* **58**: 77–84.
- Hiraoka, Y., D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1990. Temporal and spatial coordination of chromosome movement, spindle formation, and nuclear envelope breakdown during prometaphase in *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Cell Biol.* **111**: 2815–2828.
- Hiraoka, Y., J.S. Minden, J.R. Swedlow, J.W. Sedat, and D.A. Agard. 1989. Focal points for chromosome condensation and decondensation revealed by three-dimensional in

- vivo* time-lapse microscopy. *Nature* 342: 293-296.
- Hiraoka, Y., J.R. Swedlow, M.R. Paddy, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1991. Three-dimensional multiple wavelength fluorescence microscopy for the structural analysis of biological phenomena. *Semin. Cell Biol.* 2: 153-165.
- Hiraoka, Y., A.F. Dernburg, S.J. Parmelee, M.C. Rykowski, D.A. Agard, and J. W. Sedat. 1993. The onset of homologous chromosome pairing during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *J. Cell Biol.* 120: 591-600.
- Hobolth, P. 1981. Chromosome pairing in allohexaploid wheat var. Chinese spring. Transformation of multivalents into bivalents, a mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Res. Commun.* 46: 129-173.
- Hochstrasser, M., D. Mathog, Y. Gruenbaum, H. Saumweber, and J.W. Sedat. 1986. Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 102: 112-123.
- Hochstrasser, M. and J.W. Sedat. 1987. Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. I. Tissue-specific aspects of polytene nuclear architecture. *J. Cell Biol.* 104: 1455-1470.
- Holm, P.B. 1977. Three-dimensional reconstruction of chromosome pairing during the zygotene stage of meiosis in *Lilium longiflorum* (Thunb.). *Carlsberg Res. Commun.* 42: 103-151.
- Holm, P.B. and S.W. Rasmussen. 1978. Human meiosis. III. Electron microscopical analysis of chromosome pairing in an individual with a balanced translocation 46,XY,t(5p-;22p+). *Carlsberg Res. Commun.* 43: 329-350.
- . 1980. Chromosome pairing, recombination nodules and chiasma formation in the diploid *Bombyx* males. *Carlsberg Res. Commun.* 45: 483-548.
- Hotta, Y. and J. Shepard. 1973. Biochemical aspects of colchicine action on meiotic cells. *Mol. Gen. Genet.* 122: 243-260.
- Hotta, Y. and H. Stern 1971. A DNA-binding protein in meiotic cells of *Lilium*. *Dev. Biol.* 26: 8799.
- Hughes-Schrader, S. 1943. Polarization, kinetochore movements, and bivalent structure in the meiosis of male mantids. *Biol. Bull.* 85: 265-300.
- Hughes-Schrader, S. 1957. Differential polyteny and polyploidy in diaspeine coccids (*homoptera: coccoidea*). *Chromosoma* 8: 709-718.
- Hyman, A.A. and J.G. White. 1987. Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 105: 2123-35.
- Ildo, J.W., A. Baldini, D.C. Ward, S.T. Reeders, and R.A. Wells. 1991. Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9051-9055.
- Janssens, F.A. 1924. La chiasmataypie dans les insectes. Spermatogénèsis dans 1. *Stethophyma grossum* (L.) 2. *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt) *La Cellule* 34: 135-355.
- John, B. 1990. Meiosis. *Dev. Cell Biol. Ser.* 22.
- Kasha, K.J. and C.R. Burnham. 1965. The location of interchange breakpoints in barley. II. Chromosome pairing and the intercross method. *Can. J. Genet. Cytol.* 7: 620-632.
- Katsumata, M. and C.W. Lo. 1988. Organization of chromosomes in the mouse nucleus: Analysis by in situ hybridization. *J. Cell Sci.* 90: 193-199.
- Kezer, J., S.K. Sessions, and P. Leon. 1989. The meiotic structure and behavior of the strongly heteromorphic X/Y sex chromosomes of neotropical plethodontid salamanders of the genus *Oedipina*. *Chromosoma* 98: 433-442.
- Kitani, Y. 1963. Orientation, arrangement and association of somatic chromosomes. *Jpn. J. Genet.* 38: 244-256.
- Klar, A.J., J. N. Strathern, J.B. Hicks, and D. Prudente. 1983. Efficient production of a ring derivative of chromosome III by the mating-type switching mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 3: 803-810.

- Kleckner, N. and B.M. Weiner. 1993. Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic, and premeiotic cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**: 553-565.
- Klein, F., T. Laroche, M.E. Cardenas, J.F.-X. Hofmann, D. Schweizer, and S. M. Gasser. 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J. Cell Biol.* **117**: 935-948.
- Kohli, J. 1994. Telomeres lead chromosome movement. *Curr. Biol.* **4**: 724-727.
- Kohli, J. and J. Bahler. 1994. Homologous recombination in fission yeast: Absence of crossover interference and synaptonemal complex. *Experientia* **50**: 295-306.
- Lindsley, D.L. and G.G. Zimm. 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*, pp. 970-971. Academic Press, San Diego.
- Loeb, J.D., L.I. Davis, and G.R. Fink. 1993. NUP2, a novel yeast nucleoporin, has functional overlap with other proteins of the nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell* **4**: 209-222.
- Loidl, J. 1990. The initiation of meiotic pairing: The cytological view. *Genome* **33**: 759-778.
- Loidl, J., H. Scherthan, and D.B. Kaback. 1994. Physical association between non-homologous chromosomes precedes distributive disjunction in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 331-334.
- Longtine, M.S., S. Enomoto, S.L. Finstad, and J. Berman. 1993. Telomere-mediated plasmid segregation in *Saccharomyces cerevisiae* involves gene products required for transcriptional repression at silencers and telomeres. *Genetics* **133**: 171-182.
- Longtine, M.S., N.M. Wilson, M.E. Petracek, and J. Berman. 1989. A yeast telomere binding activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAP1. *Curr. Genet.* **16**: 225-239.
- Lu, B.C. 1967. Meiosis in *Coprinus lagopus*. A comparative study with light and electron microscopy. *J. Cell Sci.* **2**: 529-536.
- Lustig, A. J., S. Kurtz, and D. Shore. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* **250**: 549-553.
- Maguire, M. P. 1984. The mechanism of meiotic homologue pairing. *J. Theor. Biol.* **106**: 605-615.
- Manuelidis, L. and J. Borden. 1988. Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction. *Chromosoma* **96**: 397-410.
- Marengo, N.P. 1949. A study of the cytoplasmic inclusions during sporogenesis in *Onoclea sensibilis*. *Am. J. Bot.* **36**: 603-616.
- Mathog, D. and J.W. Sedat. 1989. The three-dimensional organization of polytene nuclei in male *Drosophila melanogaster* with compound XY or Ring X chromosomes. *Genetics* **121**: 203-311.
- Mathog, D., M. Hochstrasser, Y. Gruenbaum, H. Saumweber, and J.W. Sedat. 1984. Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei. *Nature* **308**: 414-421.
- Metz, C.W. 1916. Chromosome studies on the Diptera II. The paired association of chromosomes in the Diptera, and its significance. *J. Exp. Zool.* **21**: 213-278.
- Moens, P.B. 1969. The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in *Locusta migratoria* spermatocytes. *Chromosoma* **28**: 1-25.
- . 1973. Quantitative electron microscopy of chromosome organization at meiotic prophase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 99-107.
- Moens, P.B. and M.L. Ashton. 1985. Synaptonemal complex of normal and mutant yeast chromosomes (*Saccharomyces cerevisiae*). *Chromosoma* **91**: 113-120.
- Moens, P.B. and R.E. Pearlman. 1990. Telomere and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* **100**: 8-14.
- Moens, P.B. and F.O. Perkins. 1969. Chromosome number of a small protist: Accurate determination. *Science* **166**: 1289-1291.

- Moens, P.B., C. Bernelot-Moens, and B. Spyropoulos. 1989. Chromosome core attachment to meiotic nuclear envelope regulates synapsis in *Chloealtis* (Orthoptera). *Genome* 32: 601-610.
- Moses, M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 215-218.
- . 1968. Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2: 363-412.
- Namboodiri, A.N. and R.J. Lowry. 1967. Vegetative nuclear division in *Neurospora*. *Am. J. Bot.* 54: 735-748.
- Padmore, R., L. Cao, and N. Kleckner. 1991. Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 66: 1239-1256.
- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993b. The positioning of yeast telomeres depends on SIR3, SIR4, and the integrity of the nuclear membrane. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 733-746.
- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993b. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75: 543-555.
- Rabl, C. 1885. Über Zelltheilung. *Morpholog. Jahrbuch* 10: 214-330.
- Ramirez, C., and J.J. Miller. 1962. Observations on vegetative nuclear division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 8: 603-609.
- Rasmussen, S.W. 1976. The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Chromosoma* 54: 245-293.
- Rasmussen, S.W. and P.B. Holm. 1978. Human meiosis. II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlsberg Res. Commun* 43: 275-327.
- . 1979. Chromosome pairing in autotetraploid bombyx females. Mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Res. Commun.* 44: 101-125.
- . 1980. Mechanics of meiosis. *Hereditas* 93: 187-216.
- . 1982. The meiotic prophase in *Bombyx mori*. In *Insect ultrastructure* (ed. R.C. King and A. Akai), pp. 61-85. Plenum Press, New York.
- Rawlins, D.J., M.I. Highett, and P.J. Shaw. 1991. Localization of telomeres in plant interphase nuclei in situ hybridization and 3D confocal microscopy. *Chromosoma* 100: 424-431.
- Rickards, G.K. 1975. Prophase chromosome movements in living house cricket spermatocytes and their relationship to prometaphase, anaphase, and granule movements. *Chromosoma* 49: 407-455.
- Rubin, G.M. 1978. Isolation of a telomeric DNA sequence from *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 2: 1041-1046.
- Scherthan, H. and T. Cremer. 1994. Nonisotopic in situ hybridization in paraffin-embedded tissue sections. *Methods Mol. Genet.* 5: 223-238.
- Scherthan, H., J. Bahler, and J. Kohli. 1994. Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. *J. Cell Biol.* 127: 273-285.
- Schreiner, A. and K.E. Schreiner. 1905a. Über die Entwicklung der männlichen Geschlechtszellen von *Myxine glutonisa*. I. Vermehrungsperiode, Reifungsperiode und Reifungsteilungen. *Arch. Biol.* 21: 183-314.
- . 1905b. Über die Entwicklung der männlichen Geschlechtszellen von *Myxine glutonisa*. II. Die Centriolen und ihre Vermehrungsweise. *Arch. Biol.* 21: 183-314.
- Sen, D. and W. Gilbert. 1988. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334: 364-366.
- Sharp, L.W. 1921. *An introduction to cytology*. McGraw-Hill, New York.
- Shore, D. and K. Nasmyth. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51: 721-732.
- Solari, A.J. 1970. The spatial relationship of the X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 29: 217-236.

- . 1972. Ultrastructure and composition of the synaptonemal complex in spread and negatively stained spermatocytes of the golden hamster and albino rat. *Chromosoma* 39: 237–263.
- Sperling, K. and E.K. Lüdtke. 1981. Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac. *Chromosoma* 83: 541–553.
- Sperling, K. and P.N. Rao. 1974. The phenomenon of premature chromosome condensation: Its relevance to basic and applied research. *Humangenetik* 23: 235–58.
- Stack, S.M. and C.R. Clarke. 1973. Differential Giemsa staining of the telomeres of *Allium cepa* chromosomes: Observations related to chromosome pairing. *Can. J. Genet. Cytol.* 15: 619–624.
- Steinmüller, J., E. Schleiermacher, and H. Scherthan. 1993. Direct detection of repetitive, whole chromosome paint and telomere DNA probes by immunogold electron microscopy. *Chromosome Res.* 1: 45–51.
- Stern, H. and Y. Hotta. 1974. Biochemical controls of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 7: 37–66.
- Tabata, M. 1962. Chromosome pairing in intercrossoes between stocks of interchanges involving the same two chromosomes in maize. Diakinesis configurations. *Cytologia* 27: 410–417.
- . 1963. Chromosome pairing in intercrossoes between stocks of interchanges involving the same two chromosomes in maize. II. Pachytene configurations. *Cytologia* 28: 278–292.
- Tartof, K.D. and S. Henikoff. 1991. Trans-sensing effects from *Drosophila* to humans. *Cell* 65: 201–203.
- Thomas, J.B. and P.J. 'Kaltsikes. 1976. A bouquet-like attachment plate for telomeres in leptotene of rye revealed by heterochromatin staining. *Heredity* 36: 155–162.
- Trask, B.J., S. Allen, H. Massa, A. Fertitta, R. Sachs, G. van den Engh, and M. Wu. 1993. Studies of metaphase and interphase chromosomes using fluorescence in situ hybridization. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 767–775.
- Urata, Y., S.J. Parmelee, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1995. A three-dimensional structural dissection of *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Cell Biol.* (in press).
- Vanderlyn, L. 1948. Somatic mitosis in the root tip of *Allium cepa*—A review and orientation. *Bot. Rev.* 14: 270–318.
- von Wettstein, D., S.W. Rasmussen, and P.B. Holm. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann. Rev. Genet.* 18: 331–413.
- Vourc'h, C., D. Taruscio, A.L. Boyle, and D.C. Ward. 1993. Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase. *Exp. Cell Res.* 205: 142–151.
- Wagenaar, E.B. 1969. End-to-end chromosome attachments in mitotic interphase and their possible significance to meiotic chromosome pairing. *Chromosoma* 26: 410–426.
- Wang, S. and T. Hazelrigg. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400–403.
- Wang, Y.L. and D.L. Taylor. 1979. Distribution of fluorescently labeled actin in living sea urchin eggs during early development. *J. Cell Biol.* 81: 672–679.
- Weiner, B.A. and N. Kleckner. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* 77: 977–991.
- Wilson, E.B. 1925. *The cell in heredity and development*, third edition. MacMillan, New York.
- Zickler, D. 1977. Development of the synaptonemal complex and the "recombination nodules" during meiotic prophase in the seven bivalents of the fungus *Sordaria macrospora* Auersw. *Chromosoma* 61: 289–316.

第十二章 果蝇端粒：一种特殊类型的端粒

Mary-Lou Pardue

Department of Biology

Massachusetts Institute of Technology

Cambridge, Massachusetts 02139

染色体的末端可形成永久的独特的结构——端粒(Muller 1941),这一观点最初源于对果蝇的多年研究。综合十几年来果蝇遗传学家对染色体断裂与重排的研究结果,Muller (1938)提出:染色体的末端像帽子一样,其作用是防止断裂所形成的末端与天然末端发生融合,因为在实验中从未发现过这种融合。另外,末端缺失即使有,在实验过程中也几乎见不到(Gall 本书)。既然只要有一处不再结合的断裂便可形成末端缺失,那么末端缺失的出现频率应该相对较高。然而奇怪的是,我们很少能发现这种末端缺失现象,即使是那些已发现的末端缺失,也都因经巨型多线染色体分析后发现断端存在少量新物质而被重新归类为易位(Muller 1941;Roberts 1976)。因此 Muller 得出这样的结论:当断裂的末端不能遇到另一个断端并与之融合时,将会引起此断裂染色体(即“无端粒”染色体)的丢失,并因此导致该细胞的死亡。这种证据表明染色体末端存在具有重要作用的“帽子结构”,Muller 将这些末端称之为“端粒”。对果蝇多线染色体所进行的遗传学分析和细胞学分析为端粒提供了强有力的证据。虽然在果蝇中所进行的细胞遗传学分析很难在其他生物体内进行,但对植物和动物的研究表明所有真核生物细胞都具有相似的端粒。

端粒分子结构最初来自对原生动物和酵母的研究,但它与多种真核细胞的端粒一致(Henderson 本书)。令人不解的是,果蝇的端粒分子完全不符合这种一般结构。大多数真核生物端粒的特征是含有较短的富含 G 的“端粒酶型”重复序列,然而尽管做过多方面的尝试,但仍无法在果蝇中找到这种重复序列(见下文)。

果蝇体内好像存在着一种解决染色体末端问题的新机制——可转座的元件。我们和其他许多研究人员发现,多拷贝的端粒特异性反转录转座子(retrotransposon)(见图 12-1)存在于正常染色体的末端(见图 12-2),并可通过转座使末端缺失的染色体愈合(Biessmann et al. 1990b, 1992a, 1992b; Sheen & Levis 1994)。研究得最为清楚的元件是反转录子 HeT-A (Biessmann et al. 1994; Danilevskaya et al. 1994a)。最近的研究发现,另一个反转录子——TART 经常与 HeT-A 一同存在于完整染色体的末端,也可以转座到断裂的染色体末端(Sheen & Levis 1994)。尽管 HeT-A 和 TART 都是反转录子,但它们之间并不存在较强的家族相似性,它们在序列上要比其他任何生物体内的端粒酶型重复序列更为复杂。端粒区含有一个重复序列的混合结构,这很可能说明有更多的元件可以协同或替代 HeT-A 和 TART (Valgeirsdottir et al. 1990; Karpen & Spradling 1992; Levis et al. 1993)。

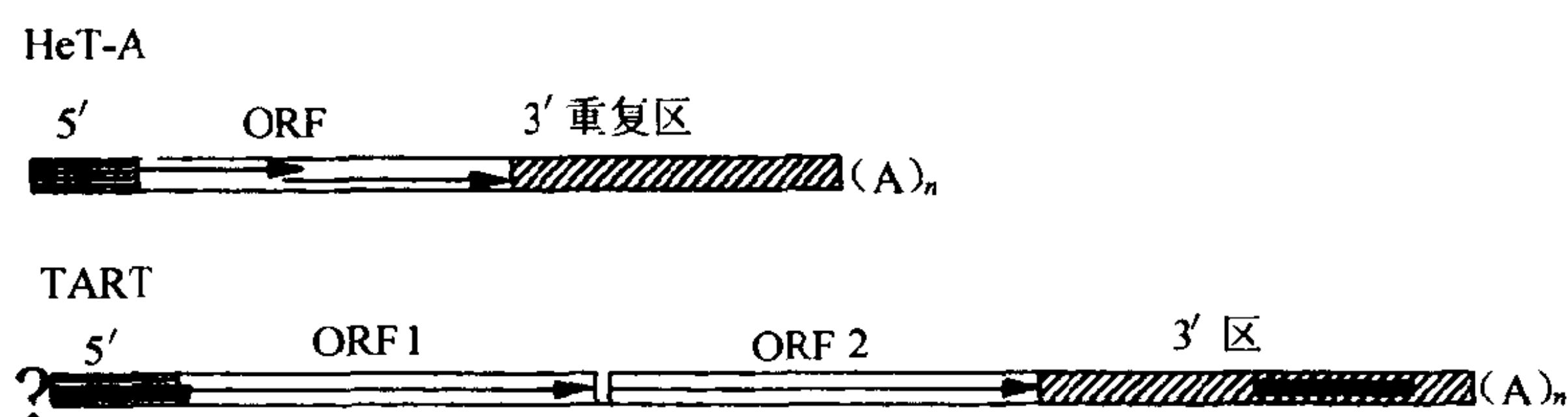


图 12-1 两个已知的果蝇端粒反转座子示意图

该序列被显示为假定的 RNA 转座中间产物。对已知的 HeT-A 序列 (Biessmann et al. 1994; Danilevskaya et al. 1994a) 进行比较, 可知共有序列元件约为 6kb。HeT-A 5' 区内的两个黑条表示富含 A 的重复序列区 (如图 12-5 所示)。已测序的最长的 TART 元件约为 10kb (Sheen & Levis 1994)。这是本图的基础。TART 5' 端的问号表示已知序列的末端, 该元件的末端至今尚未完全确定。5' 和 3' 区内的黑条代表两个重复序列区。

初看起来, 果蝇的端粒似乎很不寻常, 对研究端粒的一般特性意义不大。然而也许正是这种相反性才使我们更容易了解事情的真相。对果蝇端粒的研究很可能会为深入了解端粒的结构和功能提供一个独特的切入点。这种观点部分是基于端粒类型的系统发生分布。大多数生物, 包括很多节肢动物, 都有端粒酶型端粒。因此推测果蝇端粒很可能来自同一祖先元件, 这种祖先元件能够产生更多的共有端粒。如果是这样, 那么果蝇的端粒更可能是一种结构的修饰, 而不是复杂结构的全新改造。就像突变有助于解释野生型基因的功能一样, 结构的修饰将帮助我们了解共有端粒的标准结构。

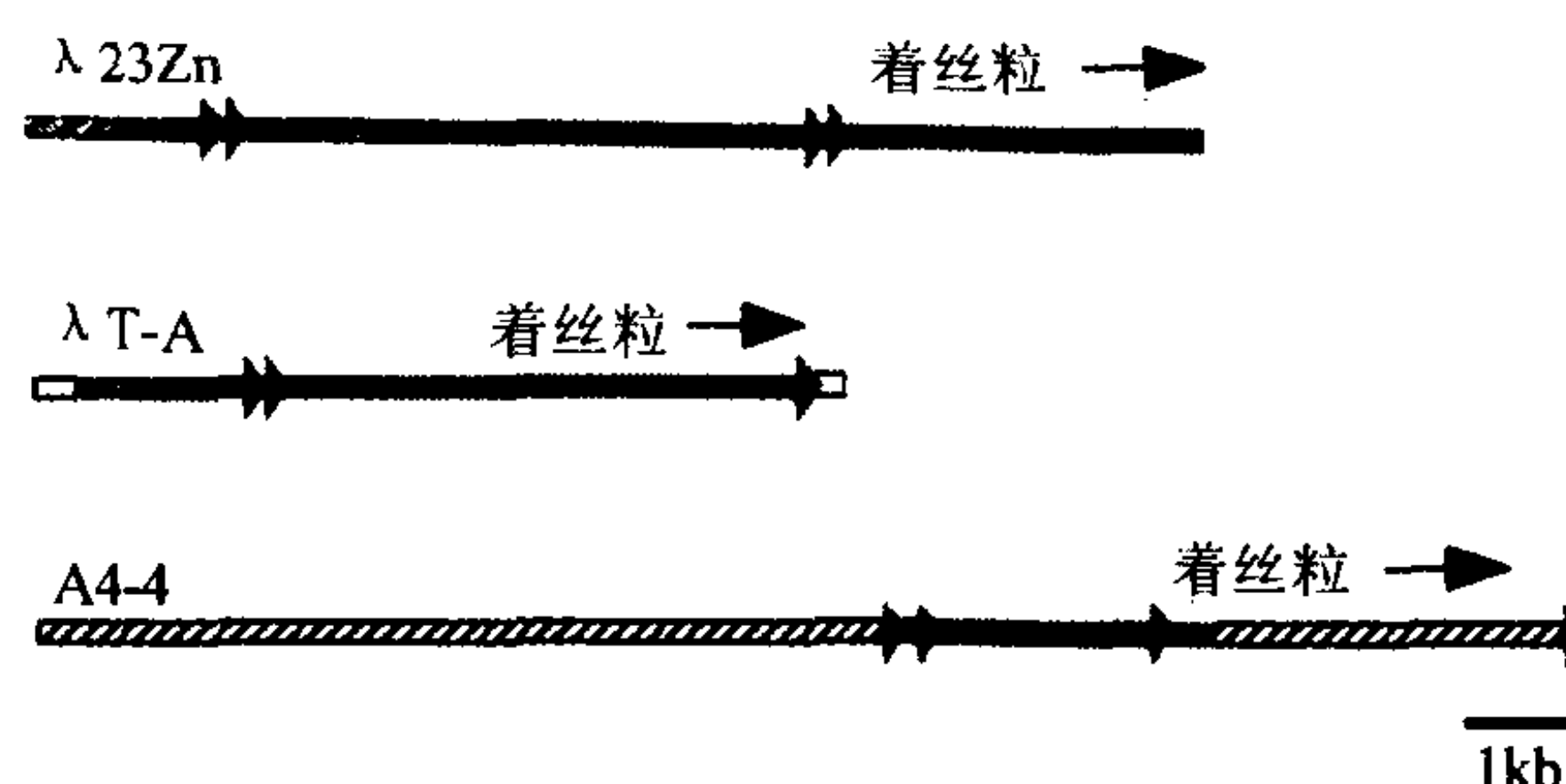


图 12-2 含有极性排列的 HeT-A 和 TART 元件的已知端粒模型

该图描述的是已知端粒中的 3 个克隆片段的测序部分。细斜线区代表 HeT-A 元件。粗斜线区代表 TART 元件, 箭头代表 HeT-A 的末端核苷酸 (小于 100bp) 以及加在其后的寡聚 A 区域。图中也标示出了假定的染色体方向。对 A4-4 克隆片段而言, 其方向性是已知的 (Levis et al. 1993)。而其他两个克隆片段的的方向性则是推测出的, 因为同一克隆片段上所有元件都具有相同方向。λT-A 克隆中只有最大的元件是完整的。A4-4 克隆中的元件没有一个是完整的。每个克隆中的不完整元件, 都在其 5' 端被截短, 而这恰是反转录子的特点。λ23Zn 克隆中只有中心元件才是完整的, 其侧翼的元件很可能在克隆过程中被截短。中心右侧的元件具有完整的 5' 端, 这一点与中心元件相同。值得注意的是, 每个完整的元件 5' 端都有一个看起来很短、很不完整的元件, 紧连着的是下一个较大元件起始。由于这个不完整的起始复制右侧元件 3' 端, 所以这个起始可能是右侧元件 LTR 的初期形式。这里没有提到元件内的插入/缺失。在 λT-A 和 TART 中的黑色小方块代表在向这些位点转座的过程当中或之后必定会发生序列重排的部分 (Valgeirsdottir et al. 1990; Levis et al. 1993)。位于 λT-A 末端的白色方块表示与 HeT-A 没有同源性的序列。

这些序列是与着丝粒和端粒都能进行杂交的片段的起始部分, 该片段的其他序列尚未测出。

尤其令人感兴趣的是果蝇端粒得以维持的机制。这种机制可以利用反转录酶将 RNA 转座中间产物转变成 DNA。其实端粒酶本身也是一种反转录酶。这两种酶都可以通过拷贝 RNA 模板来延长染色体 DNA。端粒酶与果蝇端粒的反转录酶之间最明显的差别是,端粒酶产生其 RNA 模板中一小部分序列的重复性拷贝,而果蝇的反转录酶却将整个 RNA 都进行了拷贝。不难想像,这两种酶也许是同一酶的不同修饰产物。对酶的修饰可以有效地把一种端粒转变成另一种端粒。

果蝇端粒可能是标准端粒衍生物的另一个原因是,HeT-A 序列在大小和复杂性方面都与其他生物的端粒相关序列相似。也许果蝇在进化过程中丢失了端粒酶型的重复序列,而只能利用端粒的端粒相关部分。端粒相关序列与端粒酶型的重复序列一样,也是普遍存在的,但它并未引起过多的注意。目前只对酵母(酿酒酵母)中的两个序列家族 X 和 Y' 进行了研究(Zakian 1989;Louis et al. 1994)。对不能维持端粒酶重复序列的酵母突变体的研究表明,Y' 元件可以成为维持端粒序列的后备系统(Lundblad & Blackburn 1993)。Y' 元件的这种作用确实让人感兴趣,因为 Y' 元件的特征表明它具有反转录转座的能力(Louis & Haber 1992)。但它与果蝇端粒反转录子间并无序列相似性。

果蝇的端粒除了有助于我们了解端粒及其进化之外,还使我们进一步认识可转座元件。可转座元件通常被认为是自私的寄生 DNA。通常认为,转座元件对宿主的影响主要是通过转座结果,它通过偶然改变基因活性而发挥作用。果蝇端粒是第一个依赖可转座元件活性的细胞结构,HeT-A 是可维持忠实遗传的第一个可转座元件的例子。这表明,很可能还有其他的“无私”元件,完成许多对宿主而言非常重要的其他功能。

果蝇端粒的结构研究

反转录子重复序列替代端粒酶型重复序列

真核生物端粒的突出特征之一是进化上的保守性。进化树多数分支中的很多生物,其端粒中都有短的富含 G 的重复序列,所以在果蝇端粒中寻找类似的端粒重复序列已显得非常迫切。许多实验室都在努力寻找果蝇端粒中的端粒酶型重复序列,所使用的方法包括交叉杂交、酵母细胞人工染色体功能以及其他一些用以鉴别原虫和酵母重复序列的技术。到目前为止,无论是已发表的还是未发表的结果均表明,果蝇端粒中尚未发现端粒酶型重复序列(Allshire et al. 1988;Richards & Ausubel 1988;Levis 1993;Okazaki et al. 1993;R. Moyzis 未出版;M. -L. Pardue 未出版)。下面实验的阴性结果很具有反面说服力:将取自家蚕(鳞翅目 *Bombyx mori*)的端粒重复序列(TTAGG)_n 制备成探针,检测 11 个目的昆虫 DNA 序列(Okazaki et al. 1993)。其中有 8 个目的昆虫 DNA 出现了交叉杂交结果,而双翅目(包括果蝇)中的 5 个属的 DNA 均未出现交叉杂交结果。另外,鞘翅目 8 个属中有 3 个,革翅目中的 1 个也没有出现交叉杂交结果。

从理论上讲,研究端粒序列的另一种方法是通过所克隆 DNA 的重叠片段从染色体远端位点向末端“步查”。但在实践中,由于果蝇染色体亚端粒区中存在许多重复性 DNA 片段,所以规范的“步查”是不可能的。在两种情况中,P 元件插入部分可以为亚端粒异染色质提供一个独特的起始位点,以便使“步查”向末端进行。Karpen 和 Spradling(1992)测

定了 X 染色体末端 40kb 的亚端粒染色质中近 10kb 的序列,并利用该区的 P 元件插入部分分析了一些染色体。这段约 40kb 的区域含有几种不同的端粒相关重复元件,其中包括反转录子 HeT-A。这些研究没能鉴定染色体的最远端序列。其中一条染色体,在仅距离 P 元件插入部分末端 650bp 处裂开,而且远端 40kb 序列的丢失很可能与 P 元件的插入有关。Levis 等人(1993)已经测出 P 元件插入点与 3R 染色体末端间 14.5kb 的 DNA 顺序(见图 12-2)。他们发现了很多的 HeT-A 拷贝及另一个端粒相关反转录子 TART。该染色体上最远端的序列就是 TART 元件。这个元件在所研究的 40 代传代过程中,以每代 75bp 的速度变短,这很可能是因为在复制过程中没能替换末端 RNA 引物。这项研究表明正常的端粒仅是由一串反转座子加帽的。这样的结论一定具有很大的不确定性,因为这样的染色体很可能伴随附近位点 P 元件的插入而出现末端缺失,这一点同 Karpen 和 Spradling(1992)的研究结果是相符的。正如下文将要讨论的那样,果蝇染色体在末端丢失后,其功能仍然可以再维持许多代。这样说来,对染色体的研究可能会揭示出正常端粒的结构,或者说它只不过可能是一个断端而已。

HeT-A 反转录子最初是从 λ T-A 克隆中(Young et al. 1983)分离出来的 DNA 片段。 λ T-A 克隆有着重要的意义,因为它与端粒及近着丝粒的异染色质都有很强的杂交能力,但与其他常染色质区却无杂交(见图 12-3)。(在这些实验中,可以检测出小到 40bp

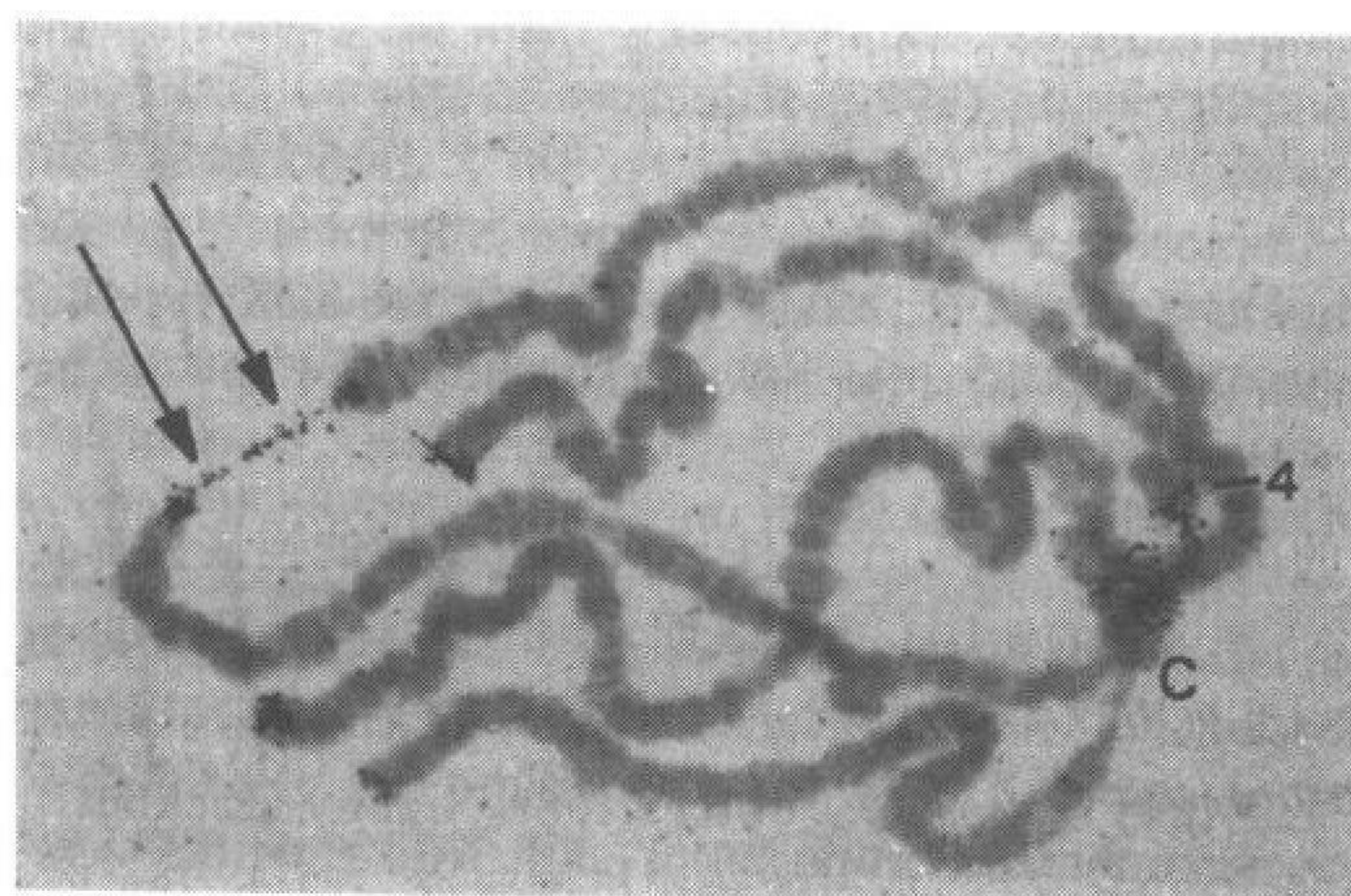


图 12-3 端粒和近着丝粒异染色质具有相同的
一套 DNA 重复序列的复杂结构。

此图是以 ^3H 标记的 λ T-A 克隆 DNA 为探针,同一组多线染色体杂交后的放射自显影图谱。杂交只见于染色体的端粒部位和近着丝粒区域,后者融合到一起形成染色质中心(C)。染色体 4 的染色质中心已散开。探针也与两个异位连接的端粒细小部分进行了杂交(箭头)。该克隆中的 HeT-A 元件只与端粒杂交,而克隆的其他部分却可以同端粒及染色质中心杂交(授权转载 Valgeirsdottir et al. 1990)。(图选自 Young et al. 1993。)

的同源 DNA。)通过对 λ T-A 约 7.4kb 片段的分析(见图 12-2),我们认为:克隆片段是由重复元件的不规则镶嵌而成,包括端粒特异性 HeT-A 元件以及其他一些位于端粒和近着丝粒异染色质中的特征不明显的元件。 λ T-A 片段可能是来自于 X 染色体上的端粒

(Valgeirsdottir et al. 1990), λ T-A 中镶嵌的重复元件与染色体中步查到端粒区所发现的镶嵌元件十分相似(Karpen & Spradling 1992; Levis 1993)。

不同端粒的 HeT-A 序列具有很大的相似性,说明这些区域间可以通过转换、转座或重组而进行交换。这种序列交换的第一个直接证据来自于对自发性开环的染色体, C(1)A 的分析。C(1)A 环构建于 1964 年,由两个 X 染色体在端粒部位连接而成,所以它含有雌性所需的全部 X 染色体的序列。这种染色体环形成以后不久便自行打开,形成一个两条 X 染色体线性相连的连接物,且 30 年来一直很稳定。环的裂口位于一个常染色质臂的中间部分,在多线染色体 13 区。由于拓扑因素,环状染色体易于断裂和丢失(Muller 1938)。C(1)A 的突出特点是断开的环的两端都以某种方式获得了一个新端粒,且两个端粒中都含有 HeT-A 序列(Traverse & Pardue 1988)。这些端粒似乎并不可能是由同源重组形成的,因为在这些细胞中,这种连接着的 X 染色体并没有同源物,而且 HeT-A 与多线染色体 13 区也没有任何序列同源性。这只能说明 HeT-A 序列可能是转座到新染色体末端的。

端粒序列与断开环的染色体相连是果蝇染色体断裂后愈合的第一个实例(末端缺失和愈合将在下文作详尽的讨论)。在发现断裂环的裂口处有新的端粒后不久,人们又发现另外两个已获得新 DNA 序列的断端。这些愈合的末端存在于 Mason 等人构建的一个 X 染色体末端缺失株(1984)。这两个愈合的染色体均是在 *yellow* 基因内被断开。因为 *yellow* 基因已被克隆出(Biessmann 1985),所以很容易对加在断裂末端的 DNA 进行克隆和测序。在这两例中,加入的 DNA 都是 HeT-A 元件的 3' 端(Biessmann et al. 1990b, 1992b)。[为方便起见,我们假设端粒反转录子部分(见图 12-2)位于 RNA 转座中间产物来加以讨论,暂不考虑这些元件在染色体上都是双链 DNA 这一事实。]在这两个染色体中, *yellow* 基因的断裂位点不同,但所加入的 DNA 片段几乎都一样。这表明加入的 DNA 片段来自转座而不是同源重组。

在两例愈合的染色体中, HeT-A 元件与 *yellow* 基因的连接处都是寡聚(A)处:一例是 A_4 , 另一例是 A_{11} 。这样的连接有力地表明, HeT-A 的转座是通过一个 poly(A)^+ RNA 中间体完成的。与染色体相连的寡聚(A)是一大类反转转录座子,包括 poly(A) 型或非 LTR 型反转座子的突出特点(Boeke & Corces 1989; Xiong & Eickbush 1990)。通过对一个这样的元件(家蚕 R2Bm 元件)进行的转座机制研究表明, R2Bm RNA 的 3' 末端必须与 DNA 断裂处相连,才能启动 RNA 的反转录(Luan et al. 1993)。由于 HeT-A 转座至染色体的末端,所以这个末端便作为断裂处的反转录起始点。因此, HeT-A RNA 的 3' 端必定附着在染色体的末端,而且反转录中最初的核苷酸应该是寡聚(A),源自 RNA 转录体的 poly(A) 尾。每个愈合的染色体上的 HeT-A 与 *yellow* 基因之间的寡聚(A)连接都应来自这种转座机制。Biessmann 等人(1992a, 1993, 1994)研究了这些愈合的染色体,发现它们以每代 1% 的速度加入更多的 HeT-A 元件,从而进行延伸。与此同时,元件以不同长度的片段从 5' 端切下。由此看来,这些愈合的端粒最终将是由许多同一方向的元件及不完整元件连接而成的链,这些链与来自 λ T-A 的已确定的端粒中的克隆链非常相似(见图 12-2)(Valgeirsdottir et al. 1990)。

最近又证明另一种端粒相关的序列 TART 也可以转座到断裂末端(sheen & Levis 1994)。这个元件曾出现在天然端粒上(Levis et al. 1993)。Sheen 和 Levis 两人对两个愈合的染色体进行了分析,直接证明 TART 可以转座至末端。在带有末端缺失的原种中可

以回收获得新的 TART 转座,这种末端缺失现象可在 P 元件移动过程中显著升高。现在还不清楚 HeT-A 和 TART 是否为丰余或是补充的部分。它们在结构上具有一定的相似性,但在有些方面也存在着明显的差异(见下文)。HeT-A 明显比 TART 多,这两种元件常常在端粒 DNA 中混杂存在。在端粒区还有其他家族的重复序列,其中有的序列也可以转座到断裂的末端。端粒相关序列能够通过同源重组或转座而特异地移入一些具有特殊靶特征的部位内,而不是 DNA 的末端。似乎这些序列中只有一小部分亚型才可以被特异地转座到染色体的末端,而不是进入端粒染色质内。目前还不清楚这种亚型中序列的数量。

HeT-A 是一种具有新特征的反转录子

通过对几个元件和不完整的部分元件的序列 (Biessmann et al. 1994; Danilevskaya et al. 1994a) 进行比较,已经推测出完整的 HeT-A 元件的结构。HeT-A 约 6kb 长,但由于所有的序列排列都需要一些缺口,所以实际的长度并没有测出。这些缺口可能代表间隔、缺失或插入,所以完整元件的长度并不确定。HeT-A 表现出反转录子的一些典型结构特征。另外 HeT-A 还具有适应其在端粒中特殊作用的新特征。该元件可被划分为三个区:约 800bp 的 5' 序列、约 2.8kb 的可读框(ORF)序列和约 2.5kb 的含有不完整的重复序列 3' 序列(见图 12-1)。

HeT-A 5' 区域

尽管一些 HeT-A 元件在 5' 端的截短存在着差别,但对最长的 HeT-A 元件的测序结果表明,在 RNA 的 5' 端(以及相应的 DNA 链)有约 800bp 的非编码序列。斑点图比较显示(见图 12-4),该区域的最突出特点是含有两个具有精确间隔的、相互重叠的重复序列。重复序列像是两个近乎正方形的重叠的同源片段,每段序列间隔约为 220 个核苷酸。这些斑点比较图是每 21 个碱基为一个窗口并且严谨度为 14,所以方形的片段并不需要反映出完整的重复序列。序列排列 (Danilevskaya et al. 1994a) 表明:明显的重复序列实际上是 A 极其丰富的 DNA 区域,这种 DNA 分子中 A 残基聚集在 DNA 的一条链上。

5' 区域是否具有功能呢? 富含 A 重复序列的区域的精确间隔说明它们也许会形成一种结构,而且很可能是通过特异性的蛋白质附着。在 DNA 的一条链上聚集的 A 残基也足以影响 DNA 本身的结构 (Wu & Carothers 1984),而且 DNA 的变形也可能具有功能重要性。HeT-A 5' 端的结构令人感兴趣有几种原因。该元件的末端必定会,至少暂时会成为染色体的末端。这种结构也许能解释为什么 HeT-A 只转座到染色体的末端。如果这种结构受到阻碍而不能与其他 DNA 结合,那么就会因为 HeT-A 不能附着在断裂的另一侧而不能成功地转座到内部的断裂处。如果染色体另一端没有附着,那么就会使远端的遗传信息丢失,导致染色体的非整倍性和细胞的死亡。

另外 5' 端的染色质结构也有可能成为内部启动子。如果所有全长的元件都能转座,那么启动子一定是内部的。因为不会在每个染色体的最末端元件上都具有 DNA 的 5' 端。果蝇的学名反转录子和人的 LINES-1 元件都有内部启动子 (Mizrohki et al. 1988; Swergold 1990)。目前我们正开始研究 HeT-A 5' 序列是否具有启动子的活性。但是基因组中 HeT-A 的拷贝实在很多。很可能其中的一个或几个是主拷贝,并且这些主拷贝也许会具

有更保守的 5' 启动子作用。如果确实存在主拷贝的话,一定是定位在异染色质上,除此之外,我们对主拷贝存在的可能性还得出什么结论,因为如果常染色质中有主拷贝,我们早就可以用原位杂交的方法在常染色体上发现它们了。

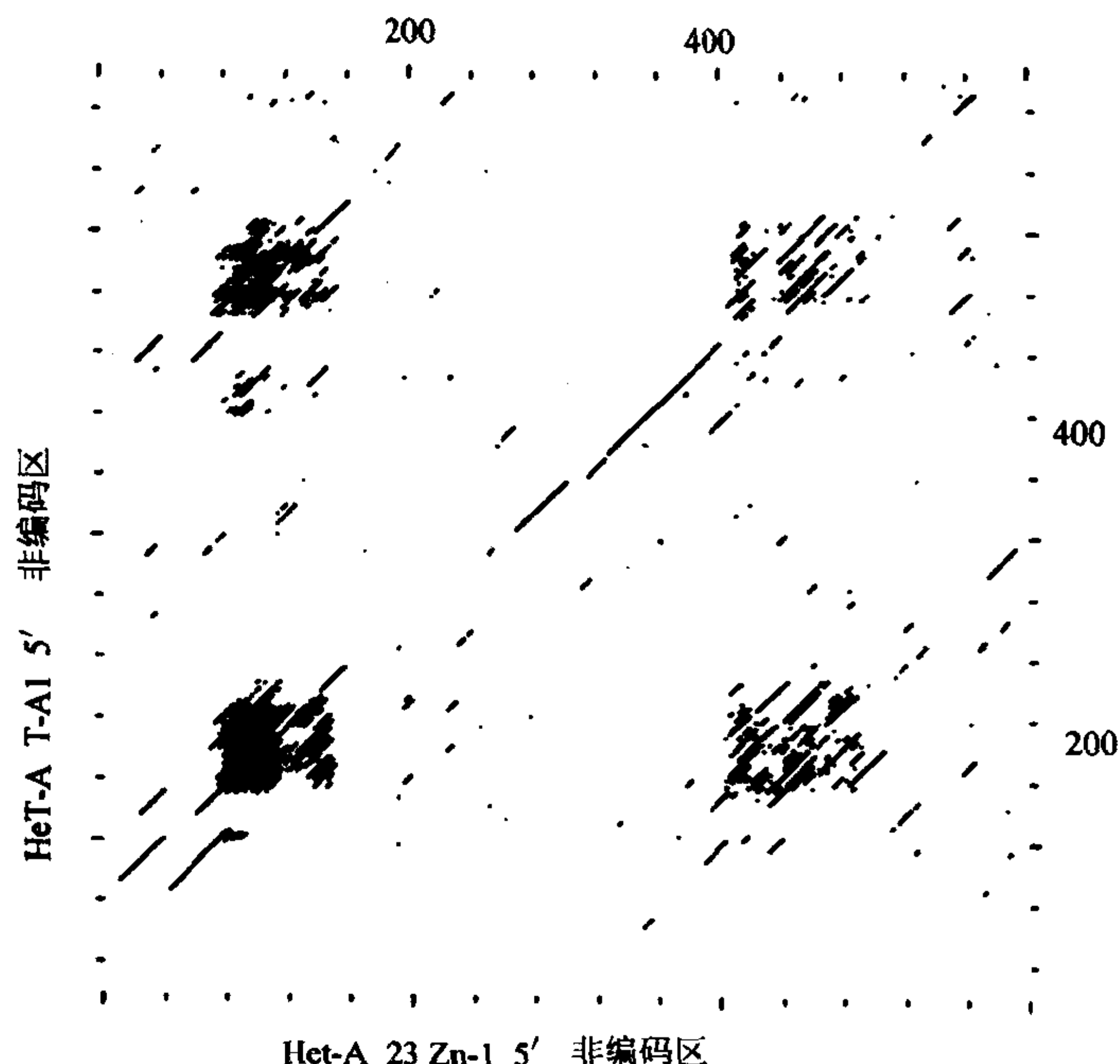


图 12-4 HeT-A 5'非编码区含有形式规则的重叠的重复序列
斑点图是元件 23 Zn-1 和 T-A1 5'区的比较图,其中以 21 个碱基对为一个窗口并且严紧度为 14。尽管中心对角线表明该区域的这个序列保守性较差,但这些元件中仍保持着重叠的重复序列间的间隔。这些重复序列主要是富含 A 的区域,集中在所描绘的链上。

HeT-A 的蛋白质编码区

HeT-A 编码区具有许多可反转录转座元件的典型特征。其中之一就是存在两个重叠的可读框,需要一个-1 核苷酸的移码以产生全长的多肽。现在已经对这个编码区中的三个明显完整的且具功能的拷贝进行了测序。一个是 23Zn-1,来源于一个已知的端粒 (Danilevskaya et al. 1992)。另外两个——9D4 和 17B3,来自于最近转座的元件 (Biesmann et al. 1992a, 1994)。尽管这三个可读框可以产生几乎完全相同的全长的(移码)多肽,但是元件 9D4 编码 918 个氨基酸,23Zn-1 编码 921 个氨基酸,而 17B3 则编码 925 个氨基酸。三种多肽长度的差别是因为有少量的插入和缺失。除了一种改变以外,其他的改变仍能保持可读框的完整性。有趣的是,能引起可读框变化的是 9D4 上的一处单核苷酸的插入,这个插入点正好位于其他元件上的两个可读框的重叠部位。我们可以得出这样的结论,9D4 上额外的核苷酸是一个插入所致,因为在这个区域中已经测序的 5 个完整和不完整的元件中,只有 9D4 具有一个多余的核苷酸 (Danilevskaya et al. 1994a)。9D4 中的插入消除了移动-1 核苷酸的移码作用,而这个作用正是其他元件产生全长多肽转录所

必需的。

需要移码翻译的重叠可读框常见于反转录转座子和反转录病毒,但在细胞基因中却很少见(Atkins et al. 1990)。HeT-A 序列的比较分析表明,移框必定发生的序列与某些脊椎动物反转录病毒,如 HIV-1 的移框区相似(Weiss et al. 1989)。HeT-A 移框似乎出现在 A 残基的六聚体部位,而不是像 HIV-1 那样出现在 U 残基六聚体上。但在这两种序列中,在紧靠移框点 5'端处的新的阅读框中都有一个终止密码子,而且在移框点之后的 ORF1 和 ORF2 之间都有一段很长的重叠部分。(HeT-A 中含有 279 个核苷酸,而 HIV-1 中含有 241 个核苷酸。)重叠的可读框也可见于果蝇其他的反转录转座子中(Bucheton et al. 1990),而 HeT-A 是最先表现出特殊类型移码区的元件。目前尚未在果蝇细胞中发现移框发生的直接证据,但是兔的网状细胞裂解物和大肠杆菌可以利用 23Zn-1 元件中的重叠可读框产生全长的多肽(Danilevskaya et al. 1994a),这表明无论是脊椎动物还是细菌核糖体,都能够识别移框信号。

尽管对 HeT-A 序列的比较表明 9D4 移码区的额外的核苷酸是一个插入部分,但仍不能证明其他的改变是否是由插入或缺失造成的。23Zn-1 可以通过缺失 3 个氨基酸产生最短的多肽链——9D4,但如果利用最长的可读框——17B3 产生 9D4 或 23Zn-1 可读框,就既需要缺失,同时又需要插入(O. Danilevskaya & M. L. Pardue 待发表)。除缺失或插入外,序列比较还揭示出很多的核苷酸变化。两个最相似的可读框——9D4 和 23Zn-1 中有 5%的核苷酸序列差异,这些差别中有一半产生同义编码子,这表明序列的选择是在多肽序列水平进行的(Danilevskaya 1994a)。

最靠近 5'端可读框的典型的反转录子主要编码 *gag* 样(*gag*-like)多肽,而另一个可读框主要编码反转录酶。HeT-A 具有锌指基序,与某些果蝇反转录子的 *gag* 样多肽类似(Biessmarn et al. 1992a; Danilevskaya et al. 1992),但与任何已知的反转录酶之间没有相似性。HeT-A 的 *gag* 样序列是非典型的,因为它是在第二个而不是第一个重叠的可读框区。靠近可读框 5'端的序列中,只有一个可识别的基序(Danilevskaya et al. 1994a),即 D(X)₄E(X)₃(G,C)XT(I,V),这是一个在 GTP 依赖性延长因子中保守存在的序列。有趣的是,HeT-A 可读框与果蝇延长因子 2 共有的不止是这个最小的基序(Grinblat et al. 1989)。这个基序好像不是 GTP 结合机制的一部分。相反,有迹象表明,在延长因子中,锌指基序可能与核蛋白体或者与肽酰 tRNA 相互作用。HeT-A 中的基序究竟有什么作用现在还不清楚,目前最令人感兴趣的是它与 RNA 结合的可能性。这些基序在所有三个完整的 HeT-A 可读框中是保守的。早期报道称 23Zn-1 中的一个锌指基序是不完整的(Danilevskaya et al. 1992),但现在证明这是不正确的(O. Danilevskaya 个人通讯)。

一般认为,移码作用是调节第二个可读框的产物量。对于反转录病毒 *gag-pol* 序列而言,这是个饶有兴趣的解释,因为 RNA 结合 ORF1 的 *gag* 产物的需要量超过了 ORF2 编码的聚合酶的量。如果 HeT-A 移框也可用来调节产物量,那么可读框的第一部分的未知产物的需求量一定会大于对 *gag* 样多肽的需要量,因为 *gag* 样序列位于 HeT-A 的移码之后。

HeT-A 的一个特殊之处就是它不能编码反转录酶。因此,这个酶必须由位于其他染色体位点上的独立基因提供。由于 HeT-A 是一个细胞成分,而不是一个寄生物,所以自身酶的缺乏也许是细胞控制 HeT-A 转座的一种调节方式。有趣的是,McClintock 最先在

引发染色体断裂的实验中检测到了可转座的元件。McClintock 提出,染色体损伤的应激力诱导了可转座元件的运动(McClintock 1978)。如果细胞利用可诱导的转座进行染色体修复,那么 McClintock 可能已经检测到了这种修复,或者说已经见到了寄生性元件的移动,这种元件移动是修复装置激活产生的结果。编码自身反转录酶的可转座元件中的 RNA 被转录之后,其自身酶的可用性便大大增加了。这将使这些转座元件在细胞中具有较大的独立性,但这一点对细胞而言却可能没什么好处。这些元件编码自身的转录酶,也许对细胞还有另一种不利因素,因为这些元件有增加自身数量的能力,所以反转录酶基因也会因此而扩增。反转录酶的随机活性造成很多假基因的出现。控制反转录酶基因的数量,有助于控制这种随机活性。

HeT-A 3'端重复序列区

我们称其为 3' 重复序列区的区域几乎包括了全部 HeT-A 3'端的一半(见图 12-1)。该区没有明显的可读框,但却有一定形式的不完整重复序列。这些序列缺乏共有序列,与 5' 区相似,在编码链上富含大量的 A 残基。这些重复序列的最突出特点是形式规则,这在任何两元件的斑点比较图中最容易见到(见图 12-5)。这个 3' 重复区是 HeT-A 区别于其

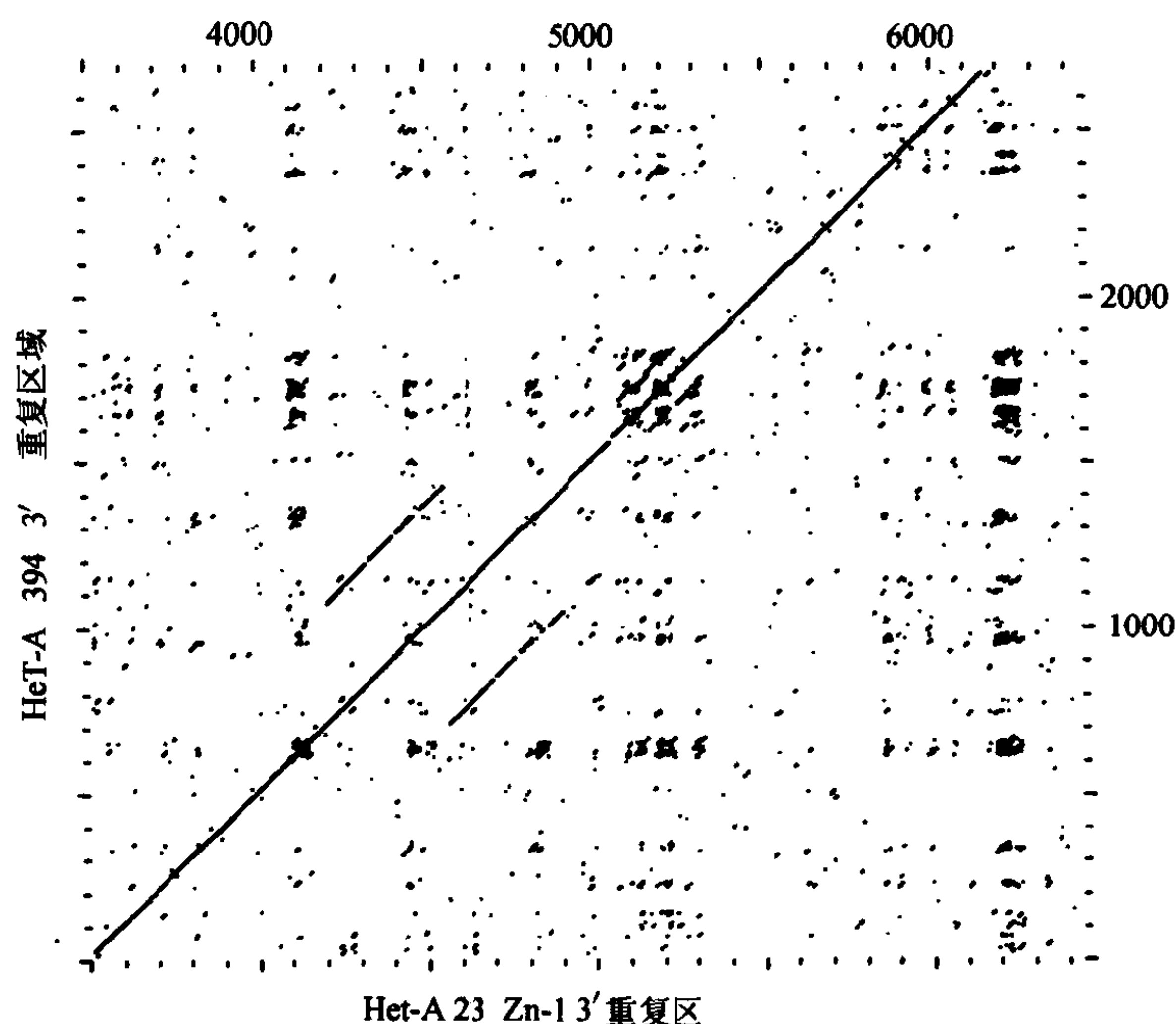


图 12-5 HeT-A 元件的大部分 3'端非编码区具有不完整重复序列的排列情况

在任何两个元件之间的斑点比较图中都很容易看到这一点。图中所示两个元件 HeT-A 394 和 23Zn-1 的比较,是已测序的元件中一致性最高的元件,然而 23Zn-1 是从已知的端粒中克隆出来的(Danilevskaya et al. 1994a),394 是最先与愈合染色体结合的元件(Biessmann et al. 1992b)。克隆出这些元件的原种在许多年里被不同的国家分别存放(23Zn 在俄国克隆,394 在加利福尼亚克隆)。3'重复端没有很强的共有序列。它们最突出的特点是富含 A,且都在 DNA 的同一条链上,常见于多少有些规则的较长排列中。斑点比较图以 21bp 为一个窗口和严紧度为 14。

他可转座元件的特性之一,这些元件中不含编码蛋白质序列的很少。由于 HeT-A 元件易于在 5' 断裂,所以含有几种不完整元件的区域便在 3' 重复序列中富集起来。我们认为这种序列可能在异染色体的染色质结构中起着重要作用(Danilevskaya et al. 1993)。Y 染色体的非端粒区,即另一个异染色质区,有一些关系极为密切的序列,但这些序列却不属于 HeT-A 元件的相关序列(见下文)。所以说,这些不完整的重复序列很可能构成了异染色质的一个基序。

对 4 个 HeT-A 元件的 3' 端重复区的序列比较显示(见图 12-6),这些序列具有较强的保守性(Biessmann et al. 1992b)。如果不考虑排列引起的缺口,在两两比较中的一致性介于 87%~76%。复合排列最突出的特征是这些缺口常常互相关联,所以一个序列出现的缺口,也许会全部或部分地存在于一个或多个其他序列中。这些互相关联的缺口没有相同的端点,而且它们与 DNA 序列的关系也很不明确。我们猜想,这些缺口表明某些区域,也许是染色质的某些结构,特别容易发生重排;或者是某些部位特别容易允许重排的出现。至于可读框,重复区的序列比较也不能提供任何线索,用以证明缺口是否代表缺失或插入。

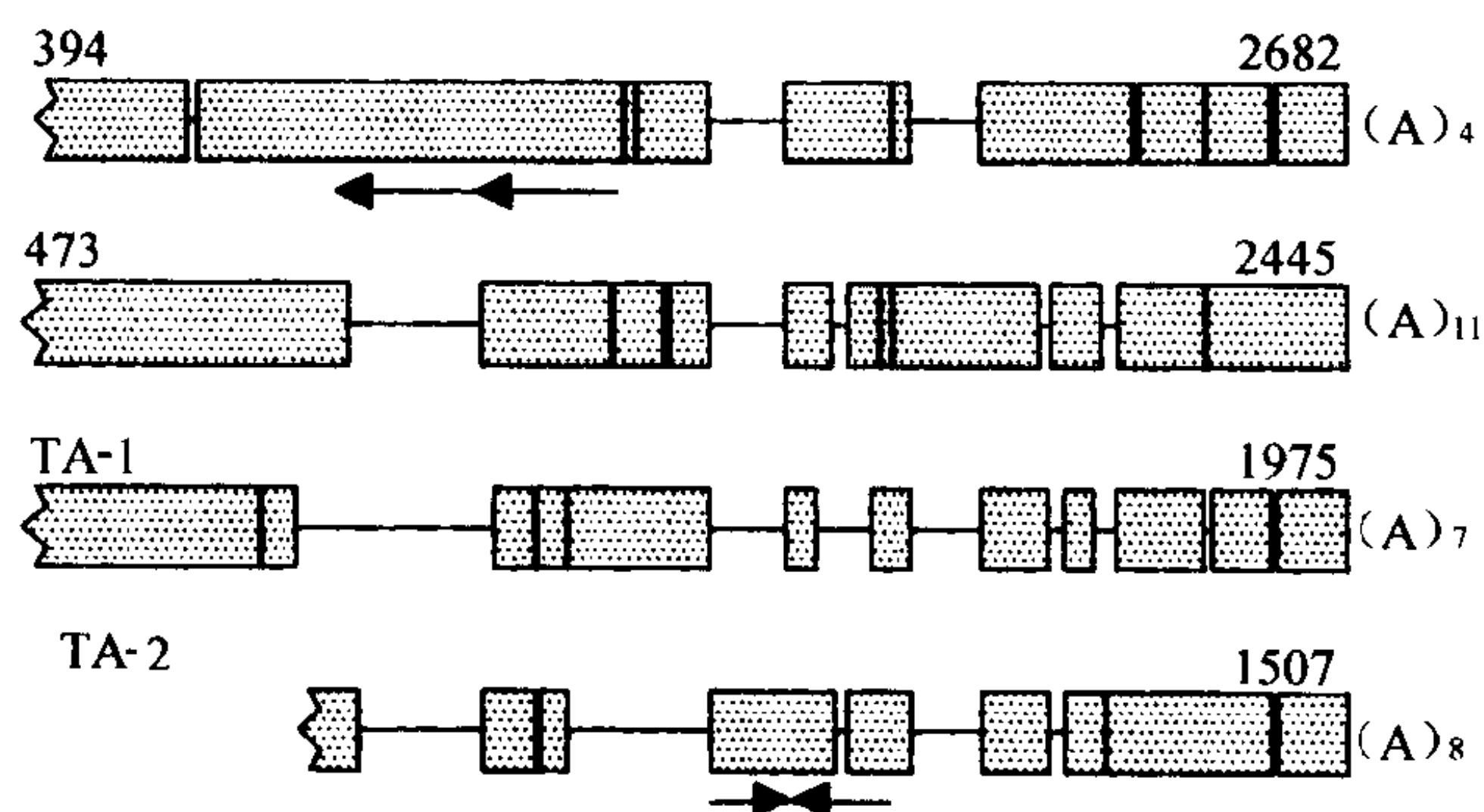


图 12-6 HeT-A 元件的保守区域中常有插入或缺失

4 个元件的 3' 端重复序列区域图显示的是被容易排列的区域(方块)以及为形成最佳排列而插入的缺口(细线)。图中标出的是大于 3bp 以上的缺口。394 和 473 元件是从最早的两个已分析的愈合染色体中克隆出来的;TA-1 和 TA-2 来自于已知的端粒(Biessmann et al. 1992b)。方框中的序列为 4 个元件之间通过两两比较,一致性大于 75% 的部分。每个元件上面的数字表示在进行比较时现有的核苷酸数量。394 元件和 TA-2 元件下的箭头代表大的串联重复。左侧齿状边缘表示元件沿这个方向伸延。这种排列中的一些缺口在三个序列中都相同,这很可能说明在第四个序列中有一个插入。在几个区域中,一个序列中的缺口,全部或部分存在于一个或多个的其他序列中。这种互相套入的缺失可能表明这些区域特别容易发生重组。

我们的序列分析表明(Biessmann et al. 1992b),最近转座的两个元件与已知端粒的两个元件之间,无论在序列相同性的数量上还是排列所需的缺口数量上,都没有明显的差异。不止一个元件拥有大量的核苷酸替代部分。奇怪的是,核苷酸替代部分并不能表明两个元件之间有什么明显的关系,因为替代部分有时为同一组的元件所共有,有时为不同组

间的元件共有。插入与缺失的端点也不像核苷酸替代部分那样常常为元件间共有。

HeT-A 转录物的全长

如果 HeT-A 确实像我们研究的那样是一种反转录子,那么至少在能发生转座的细胞中应该存在着多聚腺苷酰化的 RNA 转座中间物。所提出的完整元件的结构认为 RNA 的大小应约为 6kb,而且含有编码 HeT-A 多肽的序列,并且同一个 DNA 链上还含有 5' 和 3' 非编码区。最初我们用 Northern 杂交方法从培养的果蝇细胞的全部 RNA 中寻找这种 RNA。这些实验所检测到的主要 RNA 在凝胶电泳呈现为一条约为 6kb 的同源带 (Danilevskaya et al. 1994b)。但由于 RNA 与蛋白质的异常结合,所以从实验开始就很难弄清转录物的长度。这种结合只能被蛋白酶破坏,并进而释放出全长的 RNA。因此, HeT-A RNA 可能是与蛋白质共价结合。这种结合中的蛋白质还未被确定,但其重要性不言而喻。

杂交试验清楚地表明,HeT-A 序列是在培养细胞中转录的。有希望成为转座中间物的所有探针都与 6kb RNA 进行了杂交。但是针对 HeT-A 反义链的所有探针都没有出现特异的杂交。我们没料到反义链被转录的证据会这么少。端粒有很多 HeT-A 拷贝,其中至少有几个元件可使其他元件转座到它们之间或到它们附近 (Valgeirdottir et al. 1990; Karpen & Spradling 1992; Levis et al. 1993)。我们自然会见到,从错误方向的邻近启动子开始到 HeT-A 无关连读。缺乏非特异性的转录也许表明 HeT-A 启动子特别能适应端粒区的异染色质环境。

对人类细胞的研究表明,完整动物体内端粒酶活性的控制方式不同于永生化细胞 (Harley 本书)。那么培养的果蝇细胞能否反映出果蝇体内的情况呢? 我们现在已经能够从成熟的雄性和雌性体内检测到 RNA 制备液中的 6kb 转录物。因为这种制备液来自于整个动物,所以 HeT-A 转录物很可能来自于生殖细胞或体细胞,也可能是同时来自于这两种细胞。两性体内的这种 RNA 的检出与两性体内发生 HeT-A 转座的迹象相符。转座至断裂的 *yellow* 基因的情况只出现在雄性 (Beissmann et al. 1990b)。雌性断裂的环形 X 染色体获得新的端粒 (Traverse & Pardue 1988)。培养细胞中 HeT-A RNA 的存在会提高体细胞中出现转座的可能性。

TART 元件——端粒反转录子的又一个家族

如前所述,TART 元件最初是在从 P 元件插入点到染色体 3R 端粒的染色体步查过程中被鉴定出来的 (Levis et al. 1993)。最近,又分析了同一染色体 3 的两个愈合末端的缺失情况 (Sheen & Levis 1994)。这两个末端都已将 TART 元件添加到断裂端,并像预料的那样由寡聚(A)连接的,表明 TART 可以转座到断裂的染色体末端。现在已经对四种 TART 元件进行了测序,其中两个来自于最初的步查 (Levis et al. 1993),另两个来自于愈合的末端 (Sheen & Levis 1994)。其中三个为明显的不完整元件,第四个(10 636bp)可能是完整元件,但对其 5' 端还有一定的疑问。TART 元件可以分为三个区,与 HeT-A 的一些区域具有相似性,但也存在着一些明显的差异 (见图 12-1)。现在还没有检测到 TART 的转录物。

TART 的 5' 区

最长的 TART 元件有一个 961bp 的非编码区,位于编码区的远端。这个 962bp,连同邻近 ORF 的 85bp,与该元件 3'端前面的一段长约 500bp 的序列具有同样的序列。这些 5'-3'的重复序列是长的末端重复序列(LTR)的残留物,它赋予反转录转座子以不含 3'寡聚(A)的特征;但 LTR 延伸到 LTR 类元件的 3'端,而 TART 重复序列则没有延伸。

TART 的蛋白编码区

TART 有两个长的、非重叠的 ORF。ORF1 可以产生一个由 1043 个氨基酸构成的多肽,并在 C 端的二分之一处含有三个锌指基序。有趣的是,这三个基序所在的区域与 HeT-A 的锌指区具有相似性,且其相似程度要大于所比较的其他反转录子中的相似区域。HeT-A 和 TART 间相似的序列存在于 HeT-A 移码下游约 600bp 的范围内。HeT-A 编码区和 TART ORF1 的 N 末端无相似性。TART 的 ORF1 与 ORF2 间有一段 37bp 的间隔,由此推测 TART ORF2 需要单独的翻译起始点。ORF2 编码 1084 个氨基酸的多肽。这第二个 ORF 的序列中有许多基序,存在于典型的 LINE 型元件中编码反转录酶的 ORF2 中 (Sheen & Levis 1994)。这样说来,TART 和 HeT-A 之间的明显差别就是 TART 有能力编码自身的反转录酶。

TART 的 3' 区

同 HeT-A 一样,TART 也具有特殊的长 3'端非编码区,但是这一区域不像 HeT-A 的等位区那样具有保守性,而且也没有 HeT-A 中的那种重复序列。在染色体步查中鉴定出来的两个 TART 元件——A441 和 A442 在 3'区存在很大的差别。从愈合染色体中得来的两个元件——B1 和 B2,几乎完全相同,但却与 A441 有着明显差异,以至于 Sheen 和 Levis(1994)未能在这两个元件间发现任何有意义的排列。

端粒反转录子是如何转座的?

关于端粒转座子最有吸引力的问题是,为什么转座只限于染色体的末端?尽管一些可转座元件存在于很多位点,但对于另一些可转座元件而言,只有非常有限的靶位点。对于一些可转座元件,如果蝇核糖体 DNA I 型和 II 型插入部分以及家蚕 R2Bm 元件,其靶位只限于特定的 DNA 序列中 (Xiong & Eickbush 1988)。而对于其他元件,如酵母元件 Ty5,这种限制可能是一个特殊的染色体结构 (Zou et al. 1994)。对于 HeT-A,靶部位可能不受序列的限制。愈合染色质上,添加了 HeT-A 元件的部位之间无明显的相似性 (Biessmann et al. 1992a, 1992b)。这种序列特异性的缺乏表明,也许是染色体末端的某些结构能使某一序列成为 HeT-A 的靶位。通过 TART 愈合的两条染色体都在 *white* 基因的寡聚(A)序列上添加了转座子(一种是 A₇,另一种是 A₄)。这样说来,TART 可能具有一定程度的序列优先性,但一定要存在于染色体末端才会表现出这种优先性。

值得注意的是,向断裂染色体末端进行转座的效率还相对较低。由 Mason 等人 (1984)最先分离出来的 12 个末端缺失的染色体中,只有两个在后来的分析中获得了 HeT-A (Biessmann & Mason 1988; Biessmann et al. 1990a, 1990b),而其他的染色体都没

有获得新的序列,而且末端 DNA 都在慢慢丢失。最近,通过对含有两个愈合染色体的原种进行的研究表明,这些染色体以每代约 1% 的速度进行 DNA 的添加(Biessmann et al. 1992a)。在以前所添加的并已经被截短的 HeT-A 元件中,这些新添加的部分在随机的位置发生断裂。目前还没有测定出 TART 加入断裂末端的速度,但估计其很有可能比 HeT-A 的加入速度更低。

由于 HeT-A RNA 普遍存在于所有成年细胞中(Danilevskaya et al. 1994b),所以这种元件很可能有正常的靶位点,而且 HeT-A 对其利用的效率要比对断端的利用效率更高。我们怀疑这个靶位很可能是完整 HeT-A 元件的 5' 末端。在从已知端粒克隆出的 DNA 中,我们已经发现了三个完整的 HeT-A 元件。所有这三个元件,在它们的 5' 非编码区,紧靠着两个富含 A 片段的 5' 端,与邻近的远端 HeT-A 元件相连,且其连接部分具有几乎一致的序列(Danilevskaya et al. 1994a)。这说明在完整的元件中可能有末端染色质结构,该结构可作为完整端粒中 HeT-A 加入的优先位点。但在这一点上,对元件间的连接部分的研究提出了一个矛盾,因为有些元件的连接部分可能是下一个近端元件 5' 端中的特定位置点。另外一些元件则在下一个近端元件中的随机位点处相连,这很可能是因为在远端元件加入之前,近端元件部分就已被切除了。

果蝇端粒的功能研究

末端缺失

以前未能在果蝇中分离出的末端缺失(Muller 1938, 1941),已经在后来的实验中得到了广泛证实(Muller & Herskowitz 1954; Roberts 1976)。因为早期实验中采用的 X 射线照射方法很明显能使染色体发生断裂,所以人们普遍认为带有断裂末端的染色体会丢失,或者是因为这些断裂末端容易降解,或者是因为这些末端具有较大的黏性,容易与其他断裂末端融合。这种观点的经典证据是玉米胚乳的断裂-融合-桥循环(McClintock 1939, 1941, 1942)。然而,断裂的染色体在进入其他的玉米组织时发生了愈合,而且现在还没有可靠的证据表明在其他物种或细胞中也存在断裂-融合-桥循环。末端结合可见于肿瘤细胞和老化的组织中,但它们的出现与端粒的长度无关(Saltman et al. 1993)。黏性染色体末端和断裂-融合-桥循环的分布远比我们想像中的范围有限,而且它们并不能解释很多情况下出现的末端缺失丢失现象。

果蝇染色体在没有端粒时不能持续存在,这一经典结论已经与新近的一些研究结果发生了明显的矛盾。其中研究的最为深入的项目是由 Mason 等人发起的(1984)。开始他们用 X 光处理纯合子的 *mu-2* 雌果蝇,然后选择 *yellow* 基因断裂的雄性子代,该基因与 X 染色体的末端非常靠近。与所有早期的实验相反,他们获得了末端缺失的染色体。这些染色体随后被置于带有 X 染色体的原种中,以使缺失的 X 染色体能够在雄性系中得以传代。因此断端也就不含有能够通过重组提供新末端的完整同源物。这一实验与没能找到断裂末端的经典实验十分相似,但其中最明显的差异是,在 Mason 的实验中,所产生的染色体断裂的雌蝇是纯合的 *mu-2*。*mu-2* 突变看起来是获得末端断裂的必需条件,但维持断端却不一定需要 *mu-2* 突变。末端缺失的染色体被移入到 *mu-2* 野生型的原种中,并从 1984 年起一直在这个原种中携带。

在制造出末端缺失的几年后,携带不同缺失的原种中的 DNA 被逐一进行了分析(Biessmann & Mason 1988;Biessmann et al. 1990a)。在大多数的这种原种中,在 *yellow* 基因断裂处的远端检测不到 DNA,末端缺失的染色体仅以简单的断裂结尾,且没有加帽。尽管如此,含有这种染色体的原种并无异常,也没有出现可能由断裂末端引起的染色体黏性的迹象。有两个罕见的品系,其染色体变长。我们将在下一章里讨论这些“愈合的”染色体。大部分末端缺失的品系似乎都向“染色体加帽需要端粒”这一结论提出了挑战,但是它们也的确支持这样的假设,即随着每次 DNA 的复制,染色体末端都会逐渐变短,因为末端 RNA 引物无法得到替代。每一代果蝇,其末端缺失的染色体都要丢失约 75 个核苷酸(每个 DNA 复制循环约丢失 2bp)。

目前发现,由转座子的移动或去稳定性产生的末端缺失序列能在细胞中稳定存留。Levis(1989)收集到一组带有断裂点的缺失序列,这些断裂点聚集在 P 元件的一个末端附近。该 P 元件插入的位置已相当靠近 3 号染色体的末端。这些染色体以每代 50~100 个核苷酸的速度丢失末端 DNA,但却未表现出其他大的缺陷。Karpen 和 Spradling(1992)收集到了一种末端缺失,在 P 元件插入位点远端约 650bp 处发生断裂,但其产生却明显与插入元件有关。Zhang 和 Spradling(1993)还收集到了许多与 P 元件运动性相关的末端缺失,其中有些位于 P 元件内部,有些位于其外部。

末端缺失的染色体可以稳定存在的事实要求我们重新评价端粒在染色体加帽过程中的作用。如果末端缺失染色体的丢失不是因为染色体形成了桥或者降解了,而是因为带有新断裂染色体的细胞受到阻抑,不能完成细胞周期,那么早期研究的明显矛盾将会得到解决。这一假说提出,如果含有断端的细胞试图逃过关卡,那么也许在染色体复制的整个过程中,断端都必须以某种方式进行伪装,而且即使没有获得新的端粒序列也不会在随后的周期中激活关卡。现在认为 *mu-2* 基因控制着染色体的一个结构元件,该元件能够调节断裂染色体的修复(Wang et al. 1994)。也许这个元件就是关卡系统的一部分。如果确实如此,经 X 射线照射后的 *mu-2/mu-2* 雌果蝇,其末端缺失的获得可能是因为阻抑含有断端的细胞生长的关卡机制无效。其他的末端缺失都与转座元件的活性有关,这表明转座机制产生的染色体断裂不能被关卡识别,也正因为如此,才能像在具有完全关卡功能的细胞中那样存活。

末端缺失的果蝇染色体能够稳定保留是因为其逃过了关卡机制,这个假说已经在酵母研究中得到了某些证实。Sandell 和 Zakian(1993)已经证实,酵母染色体的断裂末端激活了与 *RAD9* 基因有关的关卡。在这些实验中,那些在没有修复断端的情况下仍可从停滞状态恢复的细胞,在以后的分裂中也不会停滞,表明断端一旦通过关卡就会被掩蔽起来。然而含缺失末端的酵母染色体在以后几代中将从细胞中丢失,这种快速的丢失与 1983 年获得的末端缺失的果蝇染色体仍然存在的事实形成鲜明对比(Mason et al. 1984)。染色体间的存活差异表明,酵母的核酸酶活性要比果蝇的强。另外,应该注意到的是酵母的 X 染色体完全是可有可无的,而果蝇的 X 染色体是雄果蝇体内惟一的 X 染色体,所以是经过严格选择的。

端粒的愈合

McClintock(1942)的报道称,玉米中的断裂染色体经过孢母细胞过程后将会愈合。目

前尚未对这些玉米染色体做分子水平上的分析,但已对其他几个生物的愈合后染色体进行了序列分析(Blackburn & Cooke 本书)。在酿酒酵母中,断裂的染色体常通过与完整的同源物重组而实现愈合(McCusker & Haber 1981;Haber & Thorburn 1984;Rudin et al. 1989),或通过与非同源染色体上的同源序列发生重组而愈合(Dunn et al. 1984),也可通过端粒酶作用于断端实现愈合(Kramer & Harber 1993)。目前已对两种生物发育过程中产生的端粒进行了研究,这两种生物是蛔虫和四膜虫(Muller et al. 1991;Yu & Blackburn 1991)。在这两种生物体内,发育调节染色体片段化过程之后,端粒酶将重复序列加到染色体片段的末端。所以说染色体末端加帽的方式有几种。我们对果蝇的研究已表明存在有另一种机制,即可转座元件的附着(Biessmann et al. 1990b;Sheen & Levis 1994)。

前面已经提到过,Mason 等人(1984)制造出了末端缺失的果蝇染色体,表明染色体在没有特殊的端粒序列存在的情况下,仍能存活几年(Biessmann & Mason 1988;Biessmann et al. 1990a)。但是在两个特殊的品系——394 和 473 中,末端缺失的染色体竟变长了,表明有新的 DNA 序列加入,这一过程被称为愈合。将愈合的染色体上的新序列进行克隆和分析后发现,两条染色体都通过 HeT-A 元件的转座而愈合(Biessmann et al. 1990b,1992b)。在研究的最初阶段,394 及 473 染色体在断端只有一个元件,而且每个元件都丢失其远端的一半。(估计染色体 394 在转座后 3~4 年进行首次克隆,而染色体 473 在转座 1~3 年后克隆。)

很明显,愈合的果蝇染色体的末端并不稳定,那么,它们能否代表端粒的完整重建呢?两年后,发现了添加有约 3kb 的元件的一群同型物的子代,它们含有 4 种主要的末端长度类型,一个长于 3kb,其他三个则短于 3kb(Biessmann et al. 1990b)。对这些子代的长期研究表明,HeT-A 元件末端以每代 70~75bp 的速度缩短,这与断端的情况相似。另外,新的 HeT-A 元件以每代约 1%的速度转座至其他元件的末端(Biessmann et al. 1992a, 1994)。上述这两种过程的结合就会产生在已知端粒中所见到的、由各种具有不同截断部位的元件所组成的长链。然而仍有许多问题还解释不清。实验中所见到的转座元件只有 HeT-A 元件,但发现其他的序列与已知端粒中的 HeT-A 元件混杂。其他实验室中已发现两种 TART 转座现象(Sheen & Levis 1994)。除 HeT-A 和 TART 以外,已知的端粒中还含有其他的序列家族。这些其他的序列是转座至末端的,还是瞄准端粒区中的内部序列而进入其中的呢?同型群体是怎样在短时间内获得长度明显不同的端粒的呢?难道就像出现在愈合的 HeT-A 品系中的那样吗(Biessmann et al. 1990b)?这是由于某些染色体的重复复制导致它们过度缩短,还是出现了内部缺失?非同源染色体端粒间的高度同源性表明,不等重组可能改变了一个染色体上端粒序列的长度。真是这样吗?

假定的 HeT-A RNA 转座中间产物持续存在于成年果蝇中(Danilevskaya et al. 1994b)的迹象又带来了新的疑问。这些 RNA 真的是起着转座中间物的作用吗?它是否还有什么其他的作用,如同转座无关或除转座的作用外,还有其他的作用吗?如果这种结构 RNA 是转座的中间物,那么与断裂染色体有关的低转座速度是否意味着转座受到的控制不是通过调节 RNA,而是通过调节其他成分进行的。

异染色质及端粒

利用巨型多线染色体可以测定出端粒区最远端具有很多非同寻常的性质。已鉴定的异染色质的染色中心,是由核中的着丝粒区域融合而成的。这些特别之处包括:具有相互聚集以形成染色中心的趋势;相对较高的断裂频率;诱导邻近基因嵌合性位置效应的能力(Muller 1938)。最近的实验进一步证明了端粒可诱导位置效应的能力,在这个实验中利用 P 元件载体将基因转座至端粒区内(Hazelrigg et al. 1984;Levis et al. 1985;L. Wallrath & S. Elgin 个人通讯)。有趣的是端粒对转入基因的位置效应不受调节物影响,而在这些调节物位于染色质中心异染色质中时,就会改变相同转基因的位置效应(L. Wallrath & S. Elgin 个人通讯)。

端粒与染色中心共有的异染色质特点,很可能是与在这两个区域内存在的某些或全部 DNA 序列有关(还包括以异染色质形式存在的 Y 染色体,该染色体不能在多线染色体核内进行研究)。例如,HeT-A 序列只见于端粒区,但是在端粒内,它们能够与同时和端粒及染色中心进行杂交的序列片段有关,但却与任何常染色质区无关(Young et al. 1983;Valgeirsdottir et al. 1990)。除典型的卫星 DNA 外,我们对与异染色质有关的序列了解甚少,端粒转座子是这类较复杂的异染色质限定序列中第一个被深入研究的。

HeT-A 和 TART 向断裂染色体末端转座的现象表明,这些元件具有遗传活性。转座需要一种 RNA 转座中间物的转录,然而目前普遍认为异染色质内的元件没有发生转录。这不由使人产生疑问,是否常染色体中存在着这两种元件主拷贝,以便产生转座元件?至少对于 HeT-A 而言,可以肯定的是,并不存在这样的常染色质主拷贝。如果 HeT-A 在常染色质中存在这样的主拷贝,那么在利用氘标记探针的多线染色体原位杂交实验便可以容易地检测到一小段 HeT-A 序列。在所研究的诸多黑腹果蝇的原种中,都没有发现这样的片段。我们还利用 HeT-A 探针,对 *D. simulans* 染色体进行了相似的原位杂交实验。在这个种属生物的常染色质中也不存在 HeT-A 序列。因此认为,从 250 万年前这些同胞种属被分离之前,定位于异染色质上的 HeT-A 便一直保守存在(Lachaise et al. 1988)。由于发现了 HeT-A RNA,所以,至少在某些细胞型中,HeT-A 启动子一定能在异染色质环境下发挥作用。

其他异染色质部位中的 HeT-A 相关序列

果蝇端粒反转录子是一种特殊的转座元件,因为每个元件都带有一个保守的非编码片段,该片段构成了这一序列的 3' 端的一半。在 HeT-A 中,这个片段含有不规则重复序列的排列。由于 HeT-A 3' 端片段在端粒异染色质中大量存在,因此有人推测这些重复序列会影响染色质的结构,起到“异染色质基序”的作用。这些重复序列与异染色质的相关性更加引人注目,因为紧密相关的重复序列竟可出现在差异明显的异染色质范围中,如 Y 染色体(Traverse & Pardue 1988;Danilevskaya et al. 1991,1993)。

由于 Y 染色体在唾液腺中不发生多线化,因此我们不能直接分析 Y 端粒,但也没有理由认为它们与其他染色体的端粒不同。被称为 HeT-A 相关的重复序列位于 Y 染色体的内

部位点上,而且通过与携带 X-Y 易位的果蝇 DNA 进行杂交实验,绘出这些位点的图谱 (Traverse & Pardue 1989; Danilevskaya et al. 1991, 1993)。HeT-A 相关重复序列和 HeT-A 元件之间的关系很特殊。HeT-A 相关重复序列表现为串联排列。这种排列方式至少有三种类型,分布在 Y 染色体的不同区域内。现已对这些排列中的两个重复单位,356 和 665 进行了测序(见图 12-7)。每一个片段都有其特殊的串联重复序列。重复序列单位的大小为 2~3kb,不同片段之间各不相同。在每一片段中,重复序列单位都由很大的片段组成,其中 80% 以上的序列同 HeT-A 3' 端重复区相似,其余部分是其他来源的一段 DNA 片段。这些所谓的“外源性”DNA 在片段与片段之间也有不同。HeT-A 相关重复序列与 HeT-A 元件之间的序列相似性同 HeT-A 元件间的序列相似性基本一致。这能混淆杂交实验的结果。第一次报道的果蝇端粒重复序列是约 3kb 的串联重复序列(Rubin 1978)。这些串连重复的序列后来被证明是来自 Y 染色体上的 HeT-A 相关序列,它可与端粒中的 HeT-A 元件交叉杂交 (Traverse & Pardue 1989)。这些重复序列组成了 356 序列。

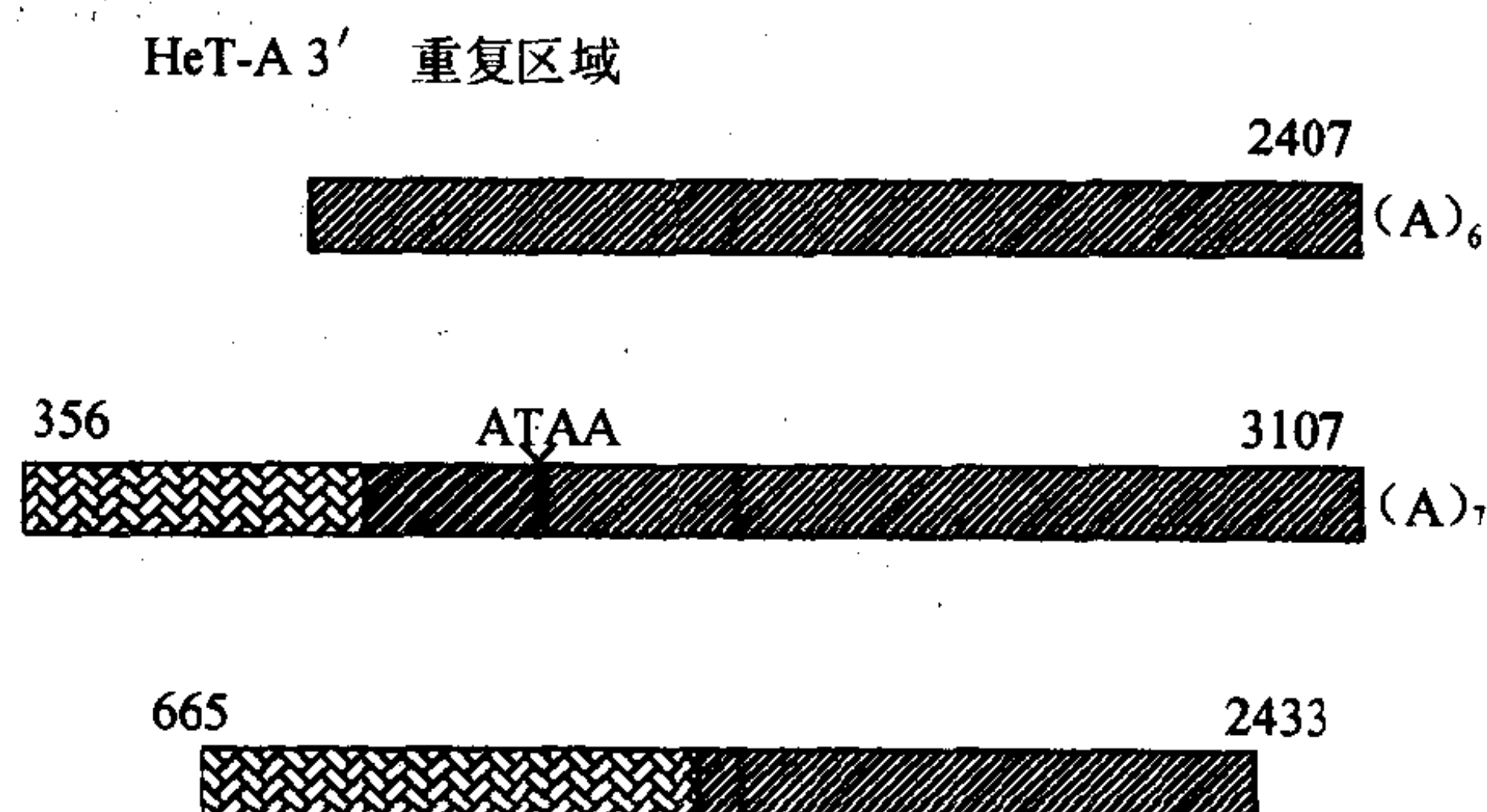


图 12-7 HeT-A 相关重复序列由较长的 HeT-A 3' 端重复区的片段与其他异染色质相关序列连接而成

图中将 HeT-A 3' 重复区域与 356 与 665 家族单位重复序列共有序列进行了比较 (Danilevskaya et al. 1993)。斜线区域是与上面的 HeT-A 序列高度相似(大于 80%)的区域。356 中的双斜线区是又一个不完整的 HeT-A 元件,它与寡聚(A)的下游区域具有相似性,而不是与图中所示的其正上方的区域相似。356 中的黑条区表示第二个元件的寡聚(A)区。这个区域存在着微小的差别,就像黑条上所标示的那样是 ATAA。人字方块表示单位重复序列中的非 HeT-A 序列。356 重复序列中的非 HeT-A 序列与 665 重复序列中的不同。数字表明了 3' 重复序列共有序列以及两个单位重复序列中的核苷酸数。

HeT-A 相关重复序列与 HeT-A 3' 端区所具有的高水平序列同一性充分说明二者密切相关。但 HeT-A 相关重复序列和 HeT-A 元件间也有一些明显的差异。例如,HeT-A 相关重复序列内从来没有 HeT-A ORF 的序列。目前已对 Y 染色体中的两个重复单位,665 与 356 片段的单位重复序列进行了序列测定 (Danileveskaya et al. 1991, 1993)。在两个片段中,单位重复的序列表明它通过某种机制转座到 Y 染色体内部,这种机制与向染色体末端转座的机制不同(见图 12-8)。665 单位重复序列中没有 3' 寡聚(A)以及端粒元件共有序列附近 240bp 的序列。这些序列可能与反转录转座有关,因此认为 665 序列与反转录

转座不同。356 单位重复序列中含有两个串联的不完整元件,即除 3' 寡聚(A)外,还含有由不同的寡聚(A)加帽的约 1300bp 相连序列构成的一个元件,以及同一方向的约 400bp 序列的另一元件。如果试图通过反转录转座至内部区域而形成 356 的 HeT-A 相关部分,那就需要连续发生两个可能罕见发生的过程。我们假设,单位重复序列由来自 DNA 端粒链的片段切割而成,然后转座至 Y 染色体内部,在这里它们同一些连接序列一起构成一个单位,以便在 Y 染色体上扩增。Y 染色体上的串联重复序列可能是无功能 DNA(junk DNA)的一个体现。然而通过与黑腹果蝇原种的对比发现,Y 染色体中的各片段非常保守,表明这些序列可能具有选择性价值。这些序列也许在 Y 异染色质的染色质结构上起着某种作用。

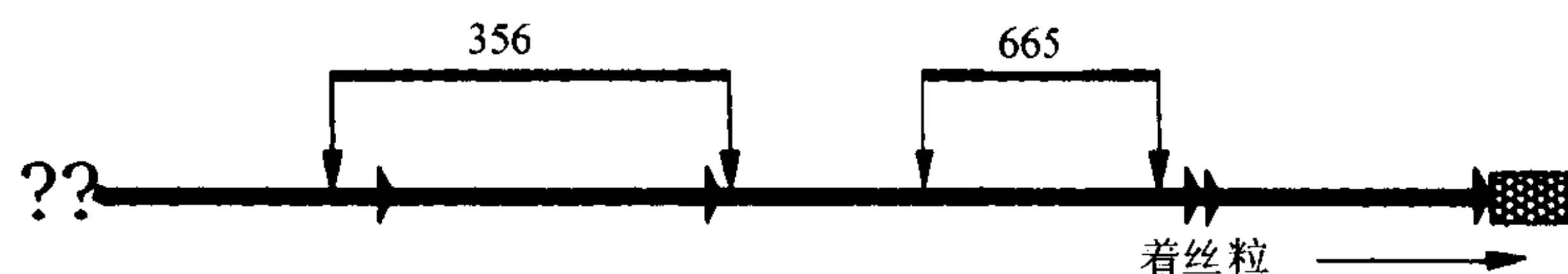


图 12-8 HeT-A 相关重复序列(356 与 665)产生的可能机制图

此图代表非常简单化的染色体末端。蜂窝样方框表示常染色质的最远端部分。粗黑线代表一条 HeT-A 元件链,线上的箭头表示每个元件上 3' 端的寡聚(A)。问号表示染色体最远端不确定的序列。黑细线上方的短线表示 356 与 665 重复序列的可能起点。箭头表示切开片段的位置,该片段可转座至 Y 染色体新位点上,也许在插入新位点时会伴有串联的扩增。356 重复序列的片段可能是通过切除一个片段而生成的,这段片段包括两个相邻 HeT-A 元件的一部分。665 重复片段可在一个 HeT-A 元件内部两次切割而成。为了简化起见,图中未列出端粒区可见的非 HeT-A 插入序列。这样的插入序列可能是 356 和 665 重复序列中非 HeT-A 部分的来源。或者可以认为,非 HeT-A 序列也许位于 Y 染色体靶位点附近,并可在 HeT-A 片段插入后并入一个扩增单位继而产生串联的重复序列。

Y 染色体上的 HeT-A 相关重复序列是经过一系列的复杂过程形成的,包括同其他序列相连,构成复合重复序列单位,然后该重复序列进行扩增。与此过程相关的机制目前还不清楚,但看起来这种机制在 Y 染色体的进化过程中已经被反复利用(Steinemann & Biessmann 1992)。海地果蝇的 Y 染色体含有约 0.2kb 的串联重复序列,这段序列同编码 26S 核糖体 RNA 的一个片段具有同源性(Huijser & Hennig 1987)。D. simulans 的 Y 染色体含有一段 2.4kb 的重复序列,这段序列同核糖体 RNA 基因中非转录间隔具有同源性(Lohe & Roberts 1990)。我们认为,来自端粒异染色质的片段也具有相似的转座和扩增,至少有一部分这种扩增片段可能在 Y 染色体的结构方面具有重要作用。Mckee 等(1992)最近提出 D. stimulans 重复序列参与了 X 和 Y 染色体的减数配对。

HeT-A 元件的进化

HeT-A 元件是协同进化现象的一个范例。在黑腹果蝇基因组中,大量的元件表现出很强的序列保守性,但是 HeT-A 探针的物种交叉杂交结合能力随着进化关系的疏远而迅速下降。尽管序列间存在很大的差异,但在所有进行 HeT-A 杂交检测的物种中,都只在端粒上检测到了交叉反应。我们认为,远源物种间杂交能力的下降主要是因为 HeT-A

序列的差异,然而,染色体末端 HeT-A 的拷贝数也很可能存在着种属差异。

序列分析表明,HeT-A 有一半的序列是编码蛋白质的,而另一半则不编码蛋白质。这很可能说明该元件的两个部分在进化过程中具有不同的速度。利用 HeT-A ORF 和 3' 重复序列探针分别进行种属交叉杂交实验,我们得到了有关这方面的一些初步证据(O. Danilevskaya et al. 未发表)。这两种探针与来自近亲种属,如 *D. simulans* 和 *D. mauritiana* (250 万年前分化)的 DNA 均有很强的杂交能力。ORF 探针与 *D. yakuba* (500 万年前分化)DNA 的杂交强度比 3' 重复序列探针强,而这两种探针都不能与 *D. pseudoobscura* 的 DNA (4000 万年前分化)很好地进行杂交。*D. yakuba* 的结果表明,ORF 比 3' 重复序列有更强的保守性。有关 HeT-A 进化方面的研究目前才只是开始,但这些序列的快速分化为我们提出了一个新的希望:一旦鉴定出这些保守基序,我们就可以更好地认识端粒转座子。

结语

尽管果蝇端粒与端粒酶型端粒间存在着明显的差异,但也有其明显的相似性。其中一个引人注意的相同点就是:这两种类型的端粒都是通过 RNA 模板机制进行复制的,或者是通过端粒酶进行延伸,或者是通过加入反转录子而得到延长。以 RNA 为模板的端粒复制机制保守性十分重要。当然,所有的真核生物都必须解决线性 DNA 的复制和维持问题。然而病毒也面临同样的问题。虽然病毒寄居在真核细胞内,但病毒也有几种方法解决其自身 DNA 末端问题,但所有的方法均不同于以 RNA 为模板的复制机制(Kornberg & Baker 1992)。为什么所有的已知真核细胞的染色体末端均采用这种机制?也许这种机制特别适合于染色体,因为这样可以保证端粒长度的变化不受基因组其他部分复制的影响。端粒长度调节的改变同生物体所处的发育阶段以及生长环境相关,其可变性就像人(Harley 本书)、酵母(Zakian 本书)和果蝇(Danilevskaya & Lapta 1991)体内的端粒变化一样各具特点。可调节的长度变化表明端粒序列的数量对细胞很重要。反过来,我们又会提出这样的问题:这些序列只是保护染色体末端,还是具有很多其他功能呢?不同生物体内,端粒长度变化的调节方式有许多不同的类型(Pardue 1994),这也许是因为不同的生物以不同的方式利用端粒序列。

在对果蝇端粒的研究中,最为令人惊奇的结果是发现反转录子参与了基本的细胞机制。果蝇的端粒是如何与反转录子发生联系的?反转录子是在破坏一个基因(典型的反转录子)时被发现。目前存在几个可能的假说:一种可能是果蝇已经驯化了野生的反转录子,并使它们正常工作;另一种假说认为,以 RNA 为模板的端粒先于其他反转录子。如果确实如此,那么我们现在知道的大部分反转录子,可能就是那些控制了自我转座的例外,就像原癌基因是已逃脱控制的细胞基因一样。第二个假说很有吸引力,因为产生端粒的反转录子有利于进化,且与端粒酶型端粒紧密相连。无论这一问题的答案如何,都将对我们认识端粒以及可转座元件具有重要意义。即使有一天我们发现细胞利用反转录子达到其他遗传或进化方面的目的,这也不足为奇。

致谢

感谢本实验室的成员,感谢 Ky Lowenhaupt 对手稿提出意见和建议。感谢 H. Biessmann 和 R. Levis 提供尚未发表的资料。此综述中讨论的本实验室工作得到了美国癌症协会和国家自然科学基金的资助。

参考文献

- Allshire, R.C., J.R. Gosden, S.H. Cross, G. Cranston, D. Rout, N. Sugawara, J.W. Szostak, P.A. Fantes, and N.D. Hastie. 1988. Telomeric repeat from *T. thermophila* cross-hybridizes with human telomeres. *Nature* **332**: 656-659.
- Atkins, J.F., R.B. Weiss, and R.F. Gesteland. 1990. Ribosome gymnastics—Degree of difficulty 9.5, style 10.0. *Cell* **62**: 413-423.
- Biessmann, H. 1985. Molecular analysis of the yellow gene (y) region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 7369-7373.
- Biessmann, H. and J.M. Mason. 1988. Progressive loss of DNA sequences from terminal chromosome deficiencies in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **7**: 1081-1086.
- Biessmann, H., S.B. Carter, and J.M. Mason. 1990a. Chromosome ends in *Drosophila* without telomeric DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 1758-1761.
- Biessmann, H., L.E. Champion, M. O'Hair, K. Ikenaga, B. Kasravi, and J.M. Mason. 1992a. Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A elements to receding chromosome ends. *EMBO J.* **11**: 4459-4469.
- Biessmann, H., B. Kasravi, T. Bui, G. Fujiwara, L.E. Champion, and J.M. Mason. 1994. Comparison of two active HeT-A retroposons of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **103**: 90-98.
- Biessmann, H., B. Kasravi, K. Jakes, T. Bui, K. Ikenaga, and J.M. Mason. 1993. The genomic organization of HeT-A retroposons in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **102**: 297-305.
- Biessmann, H., J.M. Mason, K. Ferry, M. d'Hulst, K. Valgeirsdottir, K.L. Traverse, and M.L. Pardue. 1990b. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell* **61**: 663-673.
- Biessmann, H., K. Valgeirsdottir, A. Lofsky, C. Chin, B. Ginther, R.W. Levis, and M.-L. Pardue. 1992b. HeT-A, a transposable element specifically involved in "healing" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3910-3918.
- Boeke, J.D. and V.G. Corces. 1989. Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 403-434.
- Bucheton, A. 1990. I transposable elements and I-R hybrid dysgenesis in *Drosophila*. *Trends Genet.* **6**: 16-21.
- Danilevskaya, O.N. and G.E. Lapta. 1991. Long telomeres in the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* are associated with amplification of subtelomeric repeat sequences. *Genet. Sel. Evol.* **23**: 15-24.
- Danilevskaya, O., A. Lofsky, E.V. Kurenova, and M.L. Pardue. 1993. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a distinctive subclass of HeT-A-related repeats. *Genetics* **134**: 531-543.
- Danilevskaya, O., F. Slot, M. Pavlova, and M.L. Pardue. 1994a. Structure of the *Drosophila* HeT-A transposon: A retrotransposon-like element forming telomeres. *Chromosoma* **103**: 215-224.
- Danilevskaya, O., F. Slot, K.L. Traverse, N.C. Hogan, and M.L. Pardue. 1994b. The *Drosophila* telomere transposon HeT-A produces a transcript with tightly bound protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 6679-6682.
- Danilevskaya, O.N., D.A. Petrov, M.A. Pavlova, A. Koga, E.V. Kurenova, and D.L. Hartl. 1992. A repetitive DNA element, associated with telomeric sequences in

- Drosophila melanogaster*, contains open reading frames. *Chromosoma* 102: 32-40.
- Danilevskaya, O.N., E.V. Kurenova, M.N. Pavlova, D.V. Bebehov, A.J. Link, A. Koga, A. Vellek, and D.L. Hartl. 1991. He-T family DNA sequences in the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* share homology with the X-linked Stellate genes. *Chromosoma* 100: 118-124.
- Dunn, B., P. Szauter, M.L. Pardue, and J.W. Szostak. 1984. Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* 39: 191-201.
- Grinblat, Y., N.H. Brown, and F.C. Kafatos. 1989. Isolation and characterization of the *Drosophila* translation elongation factor gene. *Nucleic Acids Res.* 17: 7303-7314.
- Haber, J.E. and P.C. Thorburn. 1984. Healing of broken dicentric chromosomes in yeast. *Genetics* 106: 207-226.
- Hazelrigg, T., R. Levis, and G.M. Rubin. 1984. Transformation of *white* locus DNA in *Drosophila*: Dosage compensation, *zeste* interaction, and position effects. *Cell* 36: 469-481.
- Huijser, P. and W. Hennig. 1987. Ribosomal DNA-related sequences in a Y chromosome lampbrush loop of *Drosophila hydei*. *Mol. Gen. Genet.* 206: 441-451.
- Karpen, G.H. and A.S. Spradling. 1992. Analysis of subtelomeric heterochromatin in the *Drosophila* minichromosome Dp1187 by single P element insertional mutagenesis. *Genetics* 132: 737-753.
- Kornberg, A. and T.A. Baker. 1992. *DNA replication*, 2nd edition. W.H. Freeman New York.
- Kramer, K.M. and J.E. Haber. 1993. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG₁₋₃ repeats. *Genes Dev.* 7: 2345-2356.
- Lachaise, D., M.-L. Cariou, J.R. David, F. Lemeunier, L. Tsacas, and M. Ashburner. 1988. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evol. Biol.* 22: 159-225.
- Levis, R.W. 1989. Viable deletions of a telomere from a *Drosophila* chromosome. *Cell* 58: 791-801.
- . 1993. *Drosophila melanogaster* does not share the telomeric repeat sequence of another invertebrate, *Ascaris lumbricoides*. *Mol. Gen. Genet.* 236: 440-442.
- Levis, R., T. Hazelrigg, and G.M. Rubin. 1985. Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the *white* gene of *Drosophila*. *Science* 219: 558-561.
- Levis, R.W., R. Ganesan, K. Houtchens, L.A. Tolar, and F.M. Sheen. 1993. Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell* 75: 1083-1093.
- Lohe, A.R. and P.A. Roberts. 1990. An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. *Genetics* 125: 399-406.
- Louis, E.J. and J.E. Haber. 1992. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131: 559-574.
- Louis, E.J., E.S. Naumova, A. Lee, G. Naumov, and J.E. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: Its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* 136: 789-802.
- Luan, D.D., M.H. Korman, J.L. Jakubczak, and T.H. Eickbush. 1993. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: A mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72: 595-605.
- Lundblad, V. and E.H. Blackburn. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73: 347-360.
- Mason, J.M., E. Strobel, and M.M. Green. 1984. mu-2: Mutator gene in *Drosophila* that potentiates the induction of terminal deficiencies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6090-6094.
- McClintock, B. 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome

- broken at meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **25**: 405–416.
- . 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234–282.
- . 1942. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **28**: 458–463.
- . 1978. Mechanisms that rapidly reorganize the genome. *Stadler Genet. Symp.* **10**: 25–47.
- McCusker, J.H. and J.E. Haber. 1981. Evidence of chromosomal breaks near the mating-type locus of *Saccharomyces cerevisiae* that accompany *MATa* x *MATα* matings. *Genetics* **99**: 383–403.
- McKee, B.D., L. Habera, and J.A. Vrana. 1992. Evidence that intergenic spacer repeats of *Drosophila melanogaster* rRNA genes function as X-Y pairing sites in male meiosis, and a general model for achiasmatic pairing. *Genetics* **132**: 529–544.
- Mizrohki, L.J., S.G. Georgieva, and Y.V. Ilyin. 1988. *jockey*, a mobile *Drosophila* element similar to mammalian LINEs, is transcribed from the internal promoter by RNA polymerase II. *Cell* **54**: 685–691.
- Muller, F., C. Wicky, A. Spicher, and H. Tobler. 1991. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell* **67**: 815–822.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **13**: 182–198.
- . 1941. Induced mutations in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9**: 151–167.
- Muller, H.J. and I.H. Herskowitz. 1954. Concerning the healing of chromosome ends produced by breakage in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* **88**: 177–208.
- Okazaki, S., K. Tsuchida, H. Maekawa, H. Ishikawa, and H. Fujiwara. 1993. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence (TTAGG)_n in the silkworm *Bombyx mori* and other insects. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1424–1432.
- Pardue, M.L. 1994. The ends and the middle: Putting chromosomes together. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 845–850.
- Richards, E.J. and F.M. Ausubel. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136.
- Roberts, P.A. 1976. The genetics of chromosome aberration. In *The genetics and biology of Drosophila* (ed. M. Ashburner and E. Novitski), vol. 1a, pp. 68–184. Academic Press, New York.
- Rubin, G.M. 1978. Isolation of a telomeric DNA sequence from *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 1041–1046.
- Rudin, N., E. Sugarman, and J.E. Haber. 1989. Genetic and physical analysis of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 519–534.
- Saltman, D., R. Morgan, M.L. Cleary, and T. deLange. 1993. Telomere structure in cells with chromosome end associations. *Chromosoma* **102**: 121–128.
- Sandell, I.L. and V.A. Zakian. 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729–739.
- Sheen, F.M. and R.W. Levis. 1994. Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to *Drosophila* chromosome termini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 12510–12514.
- Steinemann, M. and S. Steinemann. 1992. Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: A trap for retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 7591–7595.
- Swergold, G.D. 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6718–6729.
- Traverse, K.L. and M.L. Pardue. 1988. A spontaneously opened ring chromosome of *Drosophila melanogaster* has acquired HeT DNA sequences at both new telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 8116–8120.
- . 1989. Studies of He-T DNA sequences in the pericentric regions of *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma* **97**: 261–271.

- Valgeirsdottir, K., K.L. Traverse, and M.L. Pardue. 1990. HeT DNA: A family of mosaic repeated sequences specific for heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 7998-8002.
- Wang, M., L.E. Champion, H. Biessmann, and J.M. Mason. 1994. Mapping a mutator, *mu2*, that increases the frequency of terminal deletions in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 245: 598-607.
- Weiss, R.B., D.M. Dunn, M. Shuh, J.F. Atkins, and R.F. Gesteland. 1989. *E. coli* ribosomes re-phase on retroviral frameshift signals at rates ranging from 2 to 50 percent. *New Biol.* 1: 159-169.
- Wu, H.-M. and D.M. Carothers. 1984. The locus of sequence-directed and protein-induced DNA binding. *Nature* 308: 509-513.
- Xiong, Y. and T.H. Eickbush. 1988. Functional expression of a sequence-specific endonuclease encoded by the retrotransposon R2Bm. *Cell* 55: 235-246.
- . 1990. Origin and evolution of retroelements based on their reverse transcriptases. *EMBO J.* 9: 3353-3362.
- Young, B.S., A. Pession, K.L. Traverse, C. French, and M.L. Pardue. 1983. Telomere regions in *Drosophila* share complex DNA sequences with pericentric heterochromatin. *Cell* 34: 85-94.
- Yu, G.-L. and E.H. Blackburn. 1991. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* 67: 823-832.
- Zakian, V.A. 1989. Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 23: 579-604.
- Zhang, P. and A.C. Spradling. 1993. Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* 133: 361-373.
- Zou, S., D.A. Wright, and D.F. Voytas. 1995. The *Saccharomyces* retrotransposon family, Ty5, is associated with origins of DNA replication at the telomeres and the silent mating locus, *HMR*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 920-924.

第十三章 植物端粒

Eric J. Richards

Department of Biology

Washington University

St. Louis, Missouri 63130

在遗传学和细胞遗传学发展中,植物一直是重要的实验对象。一方面是因为历史的原因,另一方面是因为控制植物性状对农业生产具有重要意义。以植物为研究对象的突出优势还在于植物的染色体易于进行细胞学观察,而且植物材料更便于进行遗传信息的传递。选择植物为实验材料对于研究染色体元件非常重要。本章将主要进行这方面的论述。

首先让我们简要回顾一下 McClintock 的研究成果,这将有助于我们认识端粒是重要的染色体元件。然后我们再介绍近期一些有关开花植物(被子植物)中端粒的分子结构的研究成果。在很大程度上,这些分子工作着重于细胞遗传学方面的研究。近年来对植物端粒领域的研究工作主要集中于端粒的细胞学及其遗传图谱方面的研究。目前研究人员正利用植物系统中现有的遗传学和细胞学知识进行端粒的基础研究。

McClintock 对玉米端粒进行的早期研究

天然染色体末端独特性的发现,源于对果蝇和玉米中断裂染色体末端行为的观察(Gall 本书)。X 射线诱导产生的果蝇断裂染色体中极少出现末端缺失序列恢复的情况(Muller 1938;Roberts 1975)。这一结果使 Muller 提出:末端基因(即端粒)一定具有某种特殊的功能,即封闭染色体末端的功能(Muller 1938),而且这一功能不能由间质染色体区域提供。McClintock 在玉米方面的研究也得出了相似的结论。在 20 世纪 30 年代和 40 年代初期,McClintock 研究了断裂的玉米染色体末端,这种末端是由于双着丝粒染色体形成导致后期桥断裂产生的。McClintock 最先观察到双着丝粒环状染色质的断裂产生了两个末端,这两个末端不能以稳定的游离末端形式存在,而是无一例外地发生融合,形成另一个染色体环(McClintock 1932,1938)。McClintock 在随后的几年(1939~1942)间发表了很多论文,描述了减数分裂后期桥断裂后形成的断裂染色体末端的行为(McClintock 1939, 1941, 1942)。这些桥中所涉及的双着丝粒染色体源于正常染色体 9 与重排染色体 9 之间的相互交换(即一个复制短臂的臂内倒位,或者更为复杂臂间倒位加易位)。在后期桥断裂后,单个断裂末端进入子代核。单个的断端不稳定,DNA 复制后,姐妹染色质的对应断端融合,产生新的双着丝粒染色体,继而形成后期桥。这种染色质的断裂-融合-桥(BFB)循环只要开始就会在有丝分裂过程中持续存在,形成单倍体植物配子体以及三倍体胚乳。在这些组织中,断端是不稳定的,其行为与惰性的天然染色体末端完全相异。而

在双倍体胚胎组织中,其单个断裂染色体末端却有着不同的“命运”,它们以某种处理方式形成稳定的末端,进而导致 BFB 循环终止。McClintock 将这种新的稳定末端称为“愈合末端”,并强调指出这种新的染色体末端可长期保持稳定。

McClintock 对玉米的研究确定了几个重要的端粒特性。综合 Muller 的工作,McClintock 认为,端粒的一个功能是为染色体末端提供稳定的帽子结构。McClintock 还证明,在发育控制下的某个过程可以获得新的具有功能的端粒。对染色体愈合过程的全面理解还有待于对端粒的分子结构及端粒 DNA 复制机理做进一步的研究(Greider 1991,本书)。在回顾了植物端粒 DNA 结构与构成情况的分子和细胞学研究之后,本章的结尾部分收录了当前有关植物染色体愈合研究工作的一些论述。

植物端粒 DNA

许多植物物种的端粒 DNA 已被鉴定。然而,所有这些物种都是被子植物(开花植物),而其他植物,如苔藓类、蕨类以及裸子植物的端粒 DNA 还未进行过研究。对绿藻端粒感兴趣的读者请参见 Petracek 等人(1990)的文章。

被子植物的端粒 DNA 最早是从小型开花植物拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)中提取出来的(Richards & Ausubel 1988)。当时对于含有较大染色体的多细胞真核生物端粒 DNA 序列的性质还不了解。克隆出的拟南芥菜端粒主要包括 7bp 的串联重复序列——5'-TTTAGGG-3',它代表了真核细胞端粒的基本结构(即由短的富含 G 碱基的重复序列串联组成),具有很强的保守性(Henderson 本书)。

随后,采取了两种方法对少数被子植物的端粒 DNA 进行了分子克隆。一是利用单臂酵母人工染色体载体获得植物基因组 DNA,进而在芽殖酵母、酿酒酵母中接种形成端粒。这种方法被用来分离更多的拟南芥菜端粒限制片段(Richards et al. 1992),Gardiner 等人也采用了芽殖酵母补充法分离玉米端粒(J. M. Gardiner et al. 待发表)。第二种克隆方法是以一个拟南芥菜端粒重复序列寡核苷酸为锚定引物,利用聚合酶链反应获得克隆。用 PCR 方法已经从玉米(Burr et al. 1992)和大麦(Kilian & Kleinhofs 1992)中克隆分离出端粒序列。

分离出的端粒 DNA 常常既含有端粒重复结构又含有近末端的端粒相关序列。在讨论被子植物中端粒相关序列之前,我们先来看一下关于端粒重复序列和端粒重复序列排列的相关资料。

被子植物的端粒重复序列

到目前为止已鉴定了大约 20 种被子植物的端粒重复序列(见表 13-1)。有些端粒 DNA 已被分子克隆,而且测定了其端粒 DNA 的主要核苷酸序列。像上文提到的,已克隆的拟南芥菜端粒 DNA 含有串联的重复序列——5'-TTTAGGG-3'(Richards & Ausubel 1988;Richard et al. 1990),但也经常会发现这种 7bp 基序有变化(详见下文)。对分离出的玉米(Burr et al. 1992;J. M. Gardiner et al. 待发表)和大麦(Kilian & Kleinhofs 1992)的端粒 DNA 所进行的序列分析证明了其端粒中也含有 5'-TTTAGGG-3'的串联排列。在所有的例据中,克隆插入的重复序列的方向性表明,富含 G 的链总是从着丝粒到染色体末端沿着 5'至 3'方向进行。

表 13-1 被子植物端粒重复序列的鉴定

生物体	普通名称	方法 ^a	参考文献
<i>Arabidopsis thaliana</i>	拟南芥菜	克隆	Richards 和 Ausube(1988)
<i>Crepis capillaris</i>	纤细还阳参	染色体原位杂交	Richards et al. (1992)
<i>Cucumis melo</i>	甜瓜	DNA 印迹杂交	Jamilena et al. (1994)
<i>Gibasis pulchella</i>		DNA 印迹杂交	Broun et al. (1992)
<i>Glycine max</i>	大豆	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Glycine soja</i>	野大豆	DNA 印迹杂交	Kolchinshky 和 Gresshoff(1993)
<i>Haplopappus gracilis</i>	冠毛菊	直接末端标记	
<i>Hordeum vulgare</i>	大麦	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
		DNA 印迹杂交	Schwarzacher 和 Heslop-Harrison (1991)
		克隆	Cox et al. (1993)
			Wang et al. (1991,1992);
			Kilian 和 Kleinhofs(1992)
<i>Lathyrus sativus</i>	草香豌豆	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Lycopersicum esculentum</i>	番茄	染色体原位杂交	Ganal et al. (1991)
		DNA 印迹杂交	
		基因组序列	
<i>Milium vulgare</i>	粟草	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Nicotiana spp.</i>	烟草	染色体原位杂交	Parokonny et al. (1992); Cox et al. (1993)
<i>Oryza sativa</i>	水稻	DNA 印迹杂交	Wu 和 Tanksley (1993)
<i>Paphiopedilum insigne</i>	兜兰	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Pisum sativum</i>	豌豆	染色体原位杂交	Rawlins et al. (1991)
<i>Secale cereale</i>	黑麦	染色体原位杂交	Schwarzacher 和 Heslop-Harrison (1991)
<i>Tradescantia commelinoides</i>	紫露草	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Triticum aestivum</i>	小麦	染色体原位杂交	Murata et al. (1992);
			Werner et al(1992);
			Tsujimoto(1993)
<i>Vicia faba</i>	蚕豆	染色体原位杂交	Rawlins et al. (1991); Schubert et al. (1992)
<i>Vicia sativa L. subsp. nigra</i>	救荒野豌豆	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Vigna radiata</i>	绿豆	染色体原位杂交	Cox et al. (1993)
<i>Zea mays</i>	玉米	DNA 印迹杂交	Richards 和 Ausubel (1988)
		克隆	Burr et al. (1992); J. Gardiner et al. (待发表)

^a 克隆:端粒重复序列的分子克隆与 DNA 测序;基因组序列;利用基因组 DNA 模板进行的 DNA 测序;DNA 印迹杂交;用端粒重复序列探针对基因组序列进行交叉杂交;染色体原位杂交;用端粒重复序列探针对染色体末端进行交叉杂交;直接末端标记;在染色体 DNA 分子末端加入放射性标记。

除了上述物种以外,对被子植物端粒 DNA 性能的研究还需要使用端粒探针(来自克隆的拟南芥菜重复序列)或(TTTAGGG)_n寡核苷酸探针(见表 13-1)。其中之一是利用(TTTAGGG)_n引物对富含端粒基因组的限制片段进行序列测定,确定出 5'-TT(T/A)AGGG-3'就是番茄的共有端粒重复序列(Ganal et al. 1991)。(TTTAGGG)_n DNA 还被用做 DNA 印迹杂交的探针,以检测一些被子植物(如大豆,Kolchinshky & Gresshoff 1993;大麦,Roder et al. 1993;水稻,Wu & Tanksley 1993;履苔虫,Jamilena et al. 1994)基因组序列的交叉杂交情况。在某些情况下,基因组 DNA 样品事先用外切核酸酶 BAL31 处理,实验证明,交叉杂交信号对外切核酸酶具有优先敏感性。这一点同所期望的端粒限制片段相似(玉米,Richards & Ausubel 1988;番茄,Ganal et al. 1991;大麦,Wang et al. 1992)。而最常用的方法一直是使用标记的(TTTAGGG)_n探针对减数分裂或有丝分裂中的染色体分布进行原位杂交(物种和参考文献见表 13-1)。尽管染色体原位杂交实验的严谨性普遍较低,但大多数的杂交信号还是特异地存在于染色体末端。这些结果表明,TTTAGGG 基序(或与之密切相关的变异基序)是所有被子植物共有的端粒重复基序。这方面已有很多分子生物学的资料发表。

被子植物端粒重复序列的排列

端粒重复序列长度的变化

被子植物基因组的端粒限制片段,在 DNA 印迹杂交分析时呈现为散布的带状。这种性质的端粒杂交型也曾许多其他真核细胞中出现,这表明染色体末端存在着大量不同数目的串联重复序列片段。

不同被子植物间存在着端粒重复序列长度的差异,即使同一种属中的不同株之间也存在着这种差异。不同被子植物端粒重复序列的平均长度波动范围很大,最短的是约 3kbp 的拟南芥菜端粒(Richards et al. 1992),最长的是约 40kbp 的某些玉米自交品系(Burr et al. 1992)。许多研究人员发现,在特定被子植物种属的不同株之间,端粒重复序列长度也会出现差异(Burr et al. 1992,Richards et al. 1992)。玉米不同近交品系的端粒之间最显著的种内差异可达 25 倍,但到目前为止,还不清楚这种差异中有多少可用端粒相关序列的多态性来解释(Burr et al. 1992)。

在近交株中的等基因个体之间也检测到了端粒重复序列长度的差异。例如近交拟南芥菜群体中的等基因同胞个体,它们的端粒限制片段长度差异较小(Richards et al. 1992),而这却不能用亚末端区域的多态性来解释。对一个西红柿近交品系群体的同基因同胞个体的研究发现,尽管这些个体中端粒相关序列的多态性也许会导致一些差异,但这些个体中确实存在着具有高多态性的端粒限制片段(Broun et al. 1992)。同样 Röder 等人(1993)也注意到了新的端粒等位基因,并证明这些基因具有非亲代(non-parental)限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphisms, RFLP),在大麦不同亲代品系杂交时可以较高的速率产生这些基因。

到目前为止,普遍认为细胞中每条染色体的末端都有端粒重复序列作为帽子结构,该重复序列在特定物种所特有的长度范围内变化。最近的一些染色体原位杂交实验证明,在同样的细胞内不同的染色体末端之间,端粒重复序列的长度都存在着较大的差异。被子植

物单个细胞内的染色体末端之间以及单个染色体臂之间,端粒重复序列探针的杂交信号强度变化很大(Ganal et al. 1991;Schwarzacher & Heslop-Harrison 1991;Wang et al. 1991;Werner et al. 1992;Cox et al. 1993)。这些结果都说明,同样细胞内不同染色体末端的端粒重复序列的长度也有很大差异。至少在一种情况下,原位杂交信号强度的变化似乎表现出染色体特异性。用端粒重复序列探针进行标记时发现,同样细胞内,纤细还阳参(*Crepis capilaris*)辅助 B 染色体上端粒的标记强度明显高于正常 A 染色体的互补的染色体末端(Jamilena et al. 1994)。在对一些被子植物所进行的原位杂交研究中,Cox 等人(1993)发现,端粒重复序列长度增加与染色体体积增大之间存在着一种弱的相关性。

端粒重复序列长度的控制

对玉米进行的遗传学分析已开始帮助我们了解有关端粒长度的复杂调节机制。玉米端粒重复序列长度似乎处于严格的遗传控制之下,对端粒长度有影响的三个遗传基因座已经被鉴定出来(Burr et al. 1992)。这种调节机制包括正、负调节因子的作用。这些因子对植物端粒重复序列长度实施控制的过程相对较快,因为在不同基因型的亲代近交后产生单一植物子代的时间范围内,端粒长度达到一个稳定的状态。

端粒重复序列的长度很可能还受到发育调节。许多年前人们就知道哺乳动物生殖细胞中的端粒重复序列长度要比体细胞的长一些(Cooke et al. 1985;Allshire et al. 1998;Harley 本书)。最新的资料表明,哺乳动物体细胞的端粒重复序列长度会随着细胞分裂而缩短,与体细胞内可检测的端粒酶活性的丧失有关(Creider 1990;Harley et al. 1990;Hastie et al. 1990;Allsopp et al. 1992;Counter et al. 1992, Harley 本书;de Lange 本书)。这些发现对于认识细胞的衰老和癌变具有重要的意义(de Lange 1994)。现有的证据表明,被子植物营养细胞(vegetative cell)发育过程中,端粒重复序列不发生变化(Broun et al. 1992)。但是,目前还没有有关被子植物中营养性组织与种系组织(germ-line)(如花粉)间的端粒重复序列长度的比较。植物细胞一般为全能性细胞,在植物发育过程中,不存在体细胞系与种系细胞间的早期分离。因此,端粒的复制和端粒重复序列长度的维持,可能在被子植物生命周期的营养阶段一直保持不变。

被子植物端粒重复序列的亚结构

被子植物的端粒重复序列并不是完全相同的端粒重复序列的同源区。尽管到目前为止发现的初级被子植物的端粒重复序列都非常符合非简并的共有序列,但是对分离出来的端粒所进行的 DNA 序列分析表明确实存在着很多变异的端粒重复序列。这些变异的序列并不是随机分布的,而是趋向于聚集在端粒重复序列的近着丝粒边缘处。这种情况可以在早期对锥虫(Ploeg et al. 1984)和哺乳动物(Allshire et al. 1989;Richards et al. 1993)的报道中查阅到。

从拟南芥菜端粒中分离出来的核酸序列,提供了很多有关被子植物端粒重复序列亚结构的信息。拟南芥菜的端粒重复序列中可划分为三个明显不同的区域(Richards et al. 1992, 1993)。在已分离出端粒的着丝粒远端发现了均一的(TTTAGGG)_n 重复序列,这表明 TTTAGGG 重复序列可延伸至染色体的末端。而在着丝粒近端则可以看到许多可变重复序列区,其中含有的 7bp 基序在一或两个位置与标准的重复序列有差别。第三个区

域含有大小和序列各不相同的简并端粒重复序列,形成了末端重复序列的近着丝粒边界。此外,在一些分离出来的拟南芥端粒中,还发现了更为复杂的拼接结构。与拟南芥的情况相似,从大麦和玉米中克隆出来的端粒重复序列,其近着丝粒部分的核苷酸序列中也存在有变异和简并的端粒重复序列(Kilian & Kleinhofs 1992; J. M. Gardiner et al. 待发表)。

目前还不清楚端粒重复序列的亚结构来源,但大多认为与末端重复序列片段中近着丝粒边缘处突变的积累有关。这种突变是由于遗传同源化作用中的松散选择或分离作用以及发生在更远区域内的修复过程所引起的(Allshire et al. 1989; Richards et al. 1993)。

大多数情况下,变异的端粒重复序列只占端粒重复序列系统中很小的一部分,而且随机分布在不同的端粒中。曾有人报道过拟南芥中端粒重复序列的株特异性变异和染色体特异性变异(Richards et al. 1993)。

被子植物的类端粒 DNA

已在很多真核生物中发现有与端粒重复序列类似的基因组 DNA 序列。这种序列一般被称为端粒相关序列,但在这里我们称其为“端粒类似序列”。这种名称可避免人们误认为它同真正的、来自染色体末端的端粒重复序列有直接关系。在哺乳动物细胞中,端粒类似序列常与着丝粒有关,这使人认为这些序列可能是罗伯逊(Robertsonian)重排的分子残留物(Meyne et al. 1990)。Ijdo 等人的实验也证明了这一点,他们在 2 号人染色体靠近着丝粒处的罗伯逊融合的预期位点上分离出了端粒重复序列的反向重复序列(Allshire et al. 1988)。

用制作遗传图谱和染色体原位杂交的方法,人们已将端粒类似序列定位在被子植物基因组内的非端粒位点。曾有报道称,少数被子植物,如番茄中有限的间质染色体位点可以同端粒重复序列产生较弱的杂交信号(Ganal et al. 1991; Cox et al. 1993)。但目前已发表的染色体原位杂交的研究结果表明,与哺乳动物中普遍存在的间质端粒类似序列(尤其是着丝粒、端粒类似序列)相比,被子植物中间质端粒类似序列的存在并不普遍(Schwarzacher & Heslop-Harrison 1991; Wang et al. 1991, 1992; Schubert et al. 1992; Werner et al. 1992; Cox et al. 1993)。值得一提的是,已有人对经历核型重排,包括罗伯逊重排的被子植物染色体进行了检查,以便确定这种重排是否与间质端粒重复序列相关。

DNA 标记物的遗传图谱为定位间质端粒类似 DNA 序列提供了另一种方法。利用端粒重复序列探针识别的 RFLP 标记物已被定位于拟南芥(Richards et al. 1991)、大麦(Kleinhofs et al. 1993)、玉米(Burr et al. 1992; Alfenito & Birchler 1993)以及豌豆(Ellis et al. 1992)的间质染色体位置上。在拟南芥中,端粒类似序列形成一个由更大(约 500bp)更复杂的重复单位构成的串联重复序列,每个重复单位中都含有一段 150~200bp 简并端粒重复序列(Simoens et al. 1988; Richards et al. 1991)。拟南芥中含有高度重复的(280~560 拷贝/单倍体基因组)(Simoens et al. 1988)、约 500bp 的端粒类似元件,其中至少有一部分在靠近拟南芥 1 号染色体着丝粒的遗传位置处组成串联的排列(Richards et al. 1991)。Alfenito 和 Birchler(1993)最近描述了一种具有玉米 B 染色体特异性的重复性序列,该序列带有简并的端粒重复序列的串联排列。有趣的是,玉米端粒类似元件也定位于着丝粒上,在这种情况下,它是定位于 B 染色体的着丝粒上。

分离出的端粒类似序列定位于拟南芥和玉米的着丝粒上,这种图谱结果不同于染色体的原位杂交实验。对被子植物而言,后者不能表明端粒类似序列 DNA 常见于着丝粒处。这也可能是因为拟南芥和玉米的染色体属于例外的情况。另外还可能是因为所进行的原位杂交实验条件不够灵敏,以至于在着丝粒处无法检测到简并的端粒基序。但无论怎样,目前还不清楚着丝粒处的端粒序列是否具有一定的功能,或者仅仅是代表染色体重排的累积残存物或痕迹。

被子植物的端粒相关序列

端粒相关序列(telomere-associated sequence, TAS)是指与末端端粒重复序列最靠近的基因组区域(Blackburn & Szostak 1984)。这种亚末端区域具有大量的重复性 DNA 元件。同极短的端粒重复基序相比, TAS 重复序列一般都比较大,而且不同的物种间的保守性差。TAS 区域很可能是功能性端粒重复序列和染色体臂间的过渡区。现已证明,酿酒酵母中的端粒重复序列对连锁基因的转录具有负性影响(Gottschling et al. 1990; Shore 本书)。如果其他生物体内的端粒调节存在类似的作用,那么,端粒重复序列与染色体臂上的基因序列间的分离则显得十分必要。另外, TAS 重复序列,特别是那些含有大量端粒类似序列的序列,可以在末端端粒重复序列丢失的情况下充当端粒愈合底物(Dunn et al. 1984)。

已在少数几个被子植物种属中鉴定出了 TAS。玉米和大麦端粒重复序列相连的已克隆的基因组区域含有大量的重复性的元件,这与上述标准的真核生物亚端粒区的情况一致。在已分离的大麦 TAS 中,在端粒重复序列附近发现了高度重复的、118bp 长的串联重复序列 HvRT (Kilian & Kleinhofs 1992)。已鉴定的玉米 TAS 重复序列是一组短的(约 50~100bp)、中度重复性的元件,其拷贝数约为几百个(Burr et al. 1992; J. M. Gardiner et al. 待发表)。在拟南芥中发现了不同的 TAS 结构,在三个鉴定的 TAS 中,有两个含有单拷贝的区域,该区域延伸到距离端粒重复序列很近的地方(Richards et al. 1992)。剩下的一个拟南芥 TAS 区含有一个小的(短于 1kb)的低拷贝重复序列,这种重复序列也存在于其他端粒之中(Richards et al. 1992)。也许这种看似简单的端粒结构是小的流线型拟南芥基因组的特征。

应用染色体原位杂交方法已从许多被子植物种属中鉴定了位于近端粒的高度重复的串联重复序列(Bedbrook et al. 1980; Barnes et al. 1985; Lapitan et al. 1989; Wu et al. 1991; Röder et al. 1993)。到目前为止,还不清楚这些卫星序列距端粒重复序列有多近。在所选出的大麦、水稻和番茄端粒中,人们开始利用脉冲场凝胶电泳和 DNA 印迹杂交分析等法进行端粒重复序列的物理作图来解决这一问题(Ganal et al. 1991; Röder et al. 1993; Wu & Tanksley 1993)。综合这些研究结果,可以看出,一段不同长度的“间隔”区域将亚端粒卫星序列同端粒重复序列分离开来。这段间隔区长度不同,其范围估计在几千个碱基对到几十万个碱基对之间(Ganal et al. 1991; Wu & Tanksley 1993)。目前还不清楚间隔区中基因组的 DNA 性质。上面讨论过的单拷贝或中度重复性的 TAS 也许就是这种间隔序列之一。很明显,这种间隔模型不一定存在于所有的被子植物中。例如,至少有一些大麦端粒就表现出了含有可延伸至端粒重复序列的卫星重复序列(Kilian & Kleinhofs 1992)。

被子植物端粒的遗传学定位

端粒重复序列、TAS 以及端粒相关卫星探针的成功分离,将有助于我们在遗传图谱上确定出染色体末端的位置。端粒的遗传图谱定位于连锁图谱的末端,并提供了与细胞生物学标志的联系。

目前已经确定了 6 种被子植物端粒的遗传图谱(见表 13-2)。多数情况下,端粒被鉴定为 RFLP 标记物,而 RFLP 标记物是通过端粒重复序列或端粒相关卫星探针来识别的。含有端粒标记物通常不能导致连锁群的明显扩展,这表明,目前的图谱具有较好的标志覆盖范围,而且重组也不是被子植物端粒区的共有特性(Ganal et al. 1992; Tanksley et al. 1992)。

表 13-2 被子植物端粒的遗传学定位

生物体	被定位的端粒	探针	参考文献
拟南芥菜	10 中取 3	TAS	E. Richards et al. (未出版)
		TAS	Kilian 和 leinhofs(1992)
大麦	14 中取 9	telo repeat	Kleinhofs et al. (1993)
		satellite	Röder et al. (1993)
玉米	20 中取 10	TAS	Burr et al. (1992)
			J. Gardiner et al. (待发表)
豌豆 P	14 中取 1	telo repeat	Ellis et al. (1992)
水稻	24 中取 3	telo repeat	Wu 和 Tanksley(1993)
番茄	24 中取 4	satellite	Ganal et al. (1992)

TAS:端粒相关序列。telo repeat:端粒重复序列。satellite:端粒相关卫星重复序列。

被子植物的端粒细胞学

对多种生物进行的细胞学观察已经表明,间期或早前期的细胞核中,染色体并不是随机分布的。一般来讲,间期核内的各条染色体的排列形式是着丝粒聚集排列在核的一侧,与核膜相连的端粒位于核的另一侧(Agard & Sedat 1983; Fussell 1984; Mathog et al. 1984; Dernburg et al. 本书)。这种排列方式被称作 Rabl 定位,以纪念最早描述这种染色体构象的细胞学家(Fussell 1984)。Rabl 定位一直被认为是末期染色质排列的残存物,前面的着丝粒起前导作用,而端粒则拖在后面。端粒与核膜连接可能有助于保持间期核的空间顺序,而且有利于前期同源染色体的联会,这种联会通常是在靠近端粒部分开始的(Fussell 1984)。最近来自裂殖酵母的实验证明,端粒可以直接参与调节减数分裂前染色体的运动(Chikashige et al. 1994)。

在许多被子植物中都观察到间期的各条染色体的端粒聚集成簇,这与 Rabl 定位相一致。这样的例子有洋葱(Fussell 1975; Barnes et al. 1985)、小麦(Werner et al. 1992)、黑麦(Schwarzacher & Heslop-Harrison 1991)、大麦(Schwarzacher & Heslop-Harrison 1991)、豌豆(Rawlins et al. 1991)和蚕豆(Rawlins et al. 1991)。在有些情况下还观察到

端粒彼此相连的情形(Fussell 1975; Barnes et al. 1985; Rawlins et al. 1991)。

特别值得一提的是 Rawlins 等人的研究(1991),他们对豌豆和蚕豆间期核中的染色体定位进行了三维重建。他们发现豌豆和蚕豆中的端粒成簇位于核的一侧或核的边缘,并且以蚕豆中的端粒簇更为显著。有趣的是,这些研究人员还证明两个姐妹细胞中端粒所聚集的核极正好相反,如果末期染色体定向一直保留到间期的话,这是完全出乎意料的。这可能是因为出现了核旋转或戏剧性的染色质重构(Rawlins et al. 1991)。

被子植物中端粒的愈合

在本章结束前,我们再回到染色体愈合(即断裂的染色体末端获得新的端粒)这个主题上来,这是早期端粒工作的基础。已经在很多生物上进行了染色体愈合的分子机制研究。通过将预先存在的端粒易位至断裂染色体的末端(Dunn et al. 1984; Meltzer et al. 1993),或者是通过端粒重复序列的从头添加(Matsumoto et al. 1987; Pologe & Ravetch 1988; Wilkie et al. 1990; Kramer & Haber 1993)可以获得新的端粒。现已清楚端粒酶可以调节无端粒底物上的端粒重复序列的从头添加。端粒酶是一种核糖体核蛋白酶,它能将端粒重复序列添加到染色体的末端(Harrington & Greider 1991; Morin 1991; Yu & Blackburn 1991; Blackburn 本书; Cooke 本书)。

有关被子植物染色体愈合的研究主要是围绕着利用端粒重复序列探针检测储存液中愈合的端粒展开的。这些储存液中的染色体均经历了断裂和重排。利用 DNA 印迹杂交分析法在拟南芥菜中检测到一个愈合的端粒,它可以被看作是三倍体体系中的新的端粒限制片段,该三倍体携带着从正常的中间着丝粒染色体衍生出来的带有末端着丝粒的染色体(Richards & Ausubel 1988)。其他一些有关被子植物染色体愈合的研究中利用了染色体的原位杂交技术,以跟踪新端粒的获得过程。已在小麦(Werner et al. 1992; Tsujimoto 1993)、大麦(Wang et al. 1992)、黑麦(Murata et al. 1992)和烟草(Parokonny et al. 1992)的愈合染色体末端处检测到了端粒重复序列的杂交。在许多情况下,断裂位点处没有间质的端粒类似 DNA,表明愈合的端粒不是来自于裸露的“潜在”端粒。有些研究人员认为这种现象是断裂染色体末端重新加上端粒的迹象,但这也可能是染色体末端出现的小的易位就是新端粒的来源。最近, Tsujimoto(1993)进行的原位杂交实验支持端粒重复序列从头添加的观点。他的报道称,愈合的小麦染色体末端需要至少一代植物生命周期才能获得全长的端粒重复序列。

结语

到目前为止,所有有关被子植物端粒的研究工作均表明,植物是研究真核生物端粒的良好模型系统。被子植物端粒的分子结构和组成情况同哺乳动物及其他真核生物相似。但对被子植物端粒的研究,在很多领域尚落后于对其他生物的研究。例如,目前对被子植物端粒的染色质结构及端粒 DNA 的复制机制几乎一无所知。而另一方面,对被子植物端粒的细胞学和遗传学分析却很深入。在将来的工作中,研究人员有望能够利用植物实验系统所提供的便利条件,通过植物解决端粒领域内的一些重大问题。

- Agard, D.A. and J.W. Sedat. 1983. Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* 302: 676-681.
- Alfenito, M.R. and J.A. Birchler. 1993. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 135: 589-597.
- Allshire, R.C., M. Dempster, and N.D. Hastie. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeats distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17: 4611-4627.
- Allshire, R.C., J.R. Gosden, S.H. Cross, G. Cranston, D. Rout, N. Sugawara, J.S. Szostak, P.A. Fantes, and N.D. Hastie. 1988. Telomeric repeats from *T. thermophila* cross hybridize with human telomeres. *Nature* 332: 656-659.
- Allsopp, R.C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E.V. Younglai, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley. 1992. Telomere length predicts the replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10114-10118.
- Barnes, S.R., A.M. James, and G. Jamieson. 1985. The organisation, nucleotide sequence, and chromosomal distribution of a satellite DNA from *Allium cepa*. *Chromosoma* 92: 185-192.
- Bedbrook, J.R., J. Jones, R.D. Thompson, and R.B. Flavell. 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 19: 545-560.
- Blackburn, E.H. and J.W. Szostak. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 163-194.
- Broun, P., M.W. Ganai, and S.D. Tanksley. 1992. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1354-1357.
- Burr, B., F.A. Burr, E.C. Matz, and J. Romero-Severson. 1992. Pinning down loose ends: Mapping telomeres and factors affecting their length. *Plant Cell* 4: 953-960.
- Chikashige, Y., D.-Q. Ding, H. Funabiki, T. Haraguchi, S. Mashiko, M. Yanagida, and Y. Hiraoka. 1994. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* 264: 270-273.
- Cooke, H.J., W.R.A. Brown, and G.A. Rappold. 1985. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature* 317: 687-692.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921-1929.
- Cox, A.V., S.T. Bennett, A.S. Parokonny, A. Kenton, M.A. Callimassia, and M.D. Bennett. 1993. Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Ann. Bot.* 72: 239-247.
- de Lange, T. 1994. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2882-2885.
- Dunn, B., P. Szauter, M.L. Pardue, and J.W. Szostak. 1984. Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* 39: 191-201.
- Ellis, T.H.N., L. Turner, R.P. Hellens, D. Lee, C.L. Harker, C. Enard, C. Domoney, and D.R. Davies. 1992. Linkage maps in pea. *Genetics* 130: 649-663.
- Fussell, C.P. 1975. The position of interphase chromosome and late replicating DNA in centromere and telomere regions of *Allium cepa* L. *Chromosoma* 50: 201-210.
- . 1984. Interphase chromosome order: A proposal. *Genetika* 62: 193-201.
- Ganai, M.W., P. Broun, and S.D. Tanksley. 1992. Genetic mapping of tandemly repeated telomeric DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genomics* 14: 444-448.
- Ganai, M.W., N.L. Lapitan, and S.D. Tanksley. 1991. Macrostructure of the tomato telomeres. *Plant Cell* 3: 87-94.
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, and V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of PolII transcription. *Cell* 63: 751-762.

- Greider, C.W. 1990. Telomeres, telomerase and senescence. *BioEssays* **12**: 363–369.
- . 1991. Chromosome first aid. *Cell* **67**: 645–647.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458–460.
- Harrington, L.A. and C.W. Greider. 1991. Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* **353**: 451–454.
- Hastie, N.D., M. Dempster, M.G. Dunlop, A.M. Thompson, D.K. Green, and R.C. Allshire. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**: 866–868.
- Ijdo, J.W., A. Baldini, D.C. Ward, S.T. Reeders, and R.A. Wells. 1991. Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9051–9055.
- Jamilena, M., C.R. Rejon, and M.R. Rejon. 1994. A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *J. Cell Sci.* **107**: 703–708.
- Kilian, A. and A. Kleinhofs. 1992. Cloning and mapping of telomere-associated sequences from *Hordeum vulgare* L. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 153–156.
- Kleinhofs, A., A. Kilian, M.A.S. Maroof, R.M. Biyashev, P. Hayes, P.Q. Chen, N. Lapitan, A. Fenwick, T.K. Blake, V. Kanazin, E. Ananiev, L. Dahleen, D. Kudrna, J. Bollinger, S.J. Knapp, B. Liu, M. Sorrels, M. Heun, J.D. Franckowiak, D. Hoffman, R. Skadsen, and B.J. Steffenson. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 705–712.
- Kolchinshky, A. and P.M. Gresshoff. 1993. Direct end labelling of telomeres. *Genome* **36**: 224–229.
- Kramer, K.M. and J.E. Haber. 1993. New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG₁₋₃ repeats. *Genes Dev.* **7**: 2345–2356.
- Lapitan, N.L., M.W. Ganai, and S.D. Tanksley. 1989. Somatic chromosome karyotype of tomato based on in situ hybridization of the TGRI satellite repeat. *Genome* **32**: 992–998.
- Mathog, D., M. Hochstrasser, Y. Gruenbaum, H. Saumweber, and J. Sedat. 1984. Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei. *Nature* **308**: 414–421.
- Matsumoto, T., K. Fukui, O. Niwa, N. Sugawara, J.W. Szostak, and M. Yanagida. 1987. Identification of healed terminal DNA fragments in linear minichromosomes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **7**: 4424–4430.
- McClintock, B. 1932. A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **18**: 677–681.
- . 1938. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of aberrant mitotic behavior of ring shaped chromosomes. *Genetics* **23**: 315–376.
- . 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **25**: 405–416.
- . 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234–282.
- . 1942. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **28**: 458–463.
- Meltzer, P.S., X.Y. Guan, and J.M. Trent. 1993. Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nature Genet.* **4**: 252–255.
- Meyne, J., R.J. Baker, H.H. Hobart, T.C. Hsu, O.A. Ryder, O.G. Ward, J.E. Wiley, J.H. Wurster-Hill, T.L. Yates, and R.K. Moyzis. 1990. Distribution of non-telomeric sites of

- the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* **99**: 3–10.
- Morin, G.B. 1991. Recognition of a chromosome truncation site associated with α -thalassaemia by human telomerase. *Nature* **353**: 454–456.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* **13**: 181–198.
- Murata, M., N. Nakata, and Y. Yasumuro. 1992. Origin and molecular structure of a midge chromosome in a common wheat carrying rye cytoplasm. *Chromosoma* **102**: 27–31.
- Parokonny, A.S., A.Y. Kenton, Y.Y. Gleba, and M.D. Bennett. 1992. Genome reorganization in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids analysed by *in situ* hybridization. *Plant J.* **2**: 863–874.
- Petracek, M., P. Lefebvre, C. Silflow, and J. Berman. 1990. *Chlamydomonas* telomere sequences are A+T-rich but contain three consecutive G-C base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 8222–8226.
- Ploeg, L.T.H.V.D., A.Y.C. Liu, and P. Borst. 1984. Structure of growing telomeres of trypanosomes. *Cell* **36**: 459–468.
- Pologe, L.G. and J.V. Ravetch. 1988. Large deletions resulting from breakage and healing of *P. falciparum* chromosomes. *Cell* **55**: 869–874.
- Rawlins, D.J., M.I. Highett, and P.J. Shaw. 1991. Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. *Chromosoma* **100**: 424–431.
- Richards, E.J. and F.M. Ausubel. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136.
- Richards, E.J., H.M. Goodman, and F.M. Ausubel. 1991. The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3351–3357.
- Richards, E.J., S. Chao, A. Vongs, and J. Yang. 1992. Characterization of *Arabidopsis thaliana* telomeres isolated in yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4039–4046.
- Richards, E.J., A. Vongs, M. Walsh, J. Yang, and S. Chao. 1993. Substructure of telomere repeat arrays. In *The chromosome* (ed. J.S. Heslop-Harrison and R.B. Flavell), pp. 103–112. BIOS Scientific, Oxford.
- Roberts, P.A. 1975. In support of the telomere concept. *Genetics* **80**: 135–142.
- Röder, M.S., N.L.V. Lapitan, M.E. Sorrells, and S.D. Tanksley. 1993. Genetic and physical mapping of barley telomeres. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 294–303.
- Schubert, I., G. Schriever-Schwemmer, T. Werner, and I.-D. Adler. 1992. Telomeric signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: Implications for the origin of pseudoaneuploidy. *Cytogenet. Cell Genet.* **59**: 6–9.
- Schwarzacher, T. and J.S. Heslop-Harrison. 1991. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome* **34**: 317–323.
- Simoens, C.R., J. Gielen, M.V. Montagu, and D. Inze. 1988. Characterization of highly repetitive sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6753–6766.
- Tanksley, S.D., M.W. Ganai, J.P. Prince, M.C.D. Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Paterson, O. Pineda, M.S. Roder, R.A. Wing, W. Wu, and N.D. Young. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141–1160.
- Tsujimoto, H. 1993. Molecular cytological evidence for gradual telomere synthesis at the broken chromosome ends in wheat. *J. Plant Res.* **103**: 239–244.
- Wang, S., N.L.V. Lapitan, and T. Tsuchiya. 1991. Characterization of telomeres in *Hor-*

- deum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization I. Normal diploid barley. *Jpn. J. Genet.* **66**: 313–316.
- Wang, S., N.L.V. Lapitan, M. Roder, and T. Tsuchiya. 1992. Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. II. Healed broken chromosomes in telotrisomic 4L and acrotrisomic 4L^{4S} lines. *Genome* **35**: 975–980.
- Werner, J.E., R.S. Kota, and B.S. Gill. 1992. Distribution of telomeric repeats and their role in the healing of broken chromosome ends in wheat. *Genome* **35**: 844–848.
- Wilkie, A.O.M., J. Lamb, P.C. Harris, R.D. Finney, and D.R. Higgs. 1990. A truncated human chromosome 16 associated with α thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* **346**: 868–871.
- Wu, H.K., M.C. Chung, T. Wu, C.N. Ning, and R. Wu. 1991. Localization of specific repetitive DNA sequences in individual rice chromosomes. *Chromosoma* **100**: 330–338.
- Wu, K.-S. and S.D. Tanksley. 1993. Genetic and physical mapping of telomeres and macrosatellites of rice. *Plant Mol. Biol.* **22**: 861–872.
- Yu, G.-L. and E.H. Blackburn. 1991. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* **67**: 823–832.